THESE

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VII

pour obtenir

LE GRADE
DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Mireille HONTEBEYRIE

ETUDE DES RELATIONS PHYLOGENIQUES
ENTRE LES ESPECES DU GENRE *LEUCONOSTOC*

SOUTENUE LE 17 JUIN 1976 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

MM. J.M. DUBERT — Président

J.P AUBERT
G. CONTESSE
L. LE MINOR
R. STANIER
— Examinateurs

THESE

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VII

pour obtenir

LE GRADE
DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Mireille HONTEBEYRIE

ETUDE DES RELATIONS PHYLOGENIQUES
ENTRE LES ESPECES DU GENRE *LEUCONOSTOC*

SOUTENUE LE 17 JUIN 1976 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

MM.	J.M. DUBERT	Président
	J.P AUBERT	Examinateurs
	G. CONTESSE	
	L. LE MINOR	
	R. STANIER	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Que tous ceux qui m'ont aidée , par leur amitié ou leurs conseils , dans la réalisation de ce travail , reçoivent ,ici, l'expression de mes remerciements.

*

* *

ETUDE DES RELATIONS PHYLOGENIQUES ENTRE LES ESPECES DU GENRE LEUCONOSTOC

Mireille HONTEBEYRIE
Unité de Physiologie Cellulaire
Institut Pasteur

A V A N T - P R O P O S

La découverte des bactéries dans la deuxième moitié du XIXème siècle et l'isolement de souches de plus en plus nombreuses ont rapidement rendu nécessaire leur classification. Les premières classifications furent basées sur des caractères phénotypiques (coloration des parois, caractères morphologiques et culturaux). L'absence d'une sexualité classique et le manque de connaissances paléontologiques chez les bactéries ne permettent pas d'envisager une classification naturelle telle qu'elle a été établie chez les organismes supérieurs. Le développement récent des connaissances concernant le génome et son expression a incité les taxonomistes bactériens à essayer d'établir une taxonomie phylogénique qui corresponde à la définition donnée par A. Tétry : "La Systématique cherche à établir une classification naturelle reposant sur la phylogénèse". Cette classification repose sur la comparaison des molécules d'ADN ou les molécules protéiques. Nous avons modestement essayé, ici, de contribuer à l'établissement de cette classification naturelle dans le cas d'un groupe bactérien mal défini par ses caractères phénotypiques : le groupe des Leuconostoc.

*

* *

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548120_0011

I N T R O D U C T I O N

L'étude des relations immunologiques d'un enzyme isofonctionnel appliquée à la taxonomie et à la phylogénie remonte principalement aux travaux d'Arnheim et Wilson, en 1967, sur le lysozyme du blanc d'oeuf de 17 espèces d'oiseaux (1), à ceux de Szeinberg, en 1969, sur la catalase des mammifères (2) et à ceux de Margoliash, en 1970, sur les cytochromes c de 25 espèces animales (3). L'utilisation de méthodes quantitatives telle que la fixation du complément a permis de chiffrer une "distance immunologique" ou "index de dissimilarité" (4) entre les protéines isofonctionnelles par rapport à l'homologue choisi comme référence.

Afin d'établir la validité de ces études immunologiques appliquées à la phylogénie, ces auteurs essayèrent d'établir une corrélation entre les distances immunologiques déterminées par fixation du complément et les différences au niveau des séquences primaires de ces enzymes isofonctionnels. Ce fut le cas pour les lysozymes aviaires (5,6) ainsi que pour les cytochromes c (7). Ainsi pour les cytochromes c, Margoliash et Fitch ont montré qu'il existe, chez les hétérologues, une relation linéaire entre le nombre d'acides aminés différents et la distance immunologique. Dès lors, à partir des résultats obtenus par fixation du complément, il était possible de prédire le degré de ressemblance des séquences primaires parmi les protéines isofonctionnelles.

On notera que les systèmes de classification phylogénique basés sur les homologies des protéines sont en accord avec les schémas de classification basés sur les études paléontologiques.

Nous ne connaissons pas chez les bactéries un nombre suffisant de séries de séquences primaires dont la comparaison permettrait de retracer soit l'évolution d'un groupe bactérien soit les liens phylogéniques entre différents groupes.Seuls des résultats partiels ont été publiés concernant les ferrédoxines (8),les rubrédoxines (9) et le cytochrome c (8).

Dès 1965,des études immunologiques d'enzymes isofonctionnels furent entreprises permettant une approche plus rapide bien que moins précise de la classification naturelle des bactéries.Les premiers travaux ont porté sur la spécificité des uréases chez les Proteus (10) au moyen de techniques de précipitation.En 1970,Stanier et coll. ont étudié, par immunodiffusion et fixation du complément,les relations taxonomiques de deux enzymes du catabolisme du benzoate chez les Pseudomonas,montrant qu'il existe une grande divergence évolutive au sein de ce groupe bactérien (11).

Cependant,une telle approche immunologique quantitative ne permet pas d'identifier ce qu'elle quantifie. Ainsi,la même distance immunologique peut être appliquée à deux hétérologues possédant des sites antigéniques différents qualitativement.Des réactions de précipitation en gel,utilisées ultérieurement par différents auteurs (12,13,14,15,16) ont permis d'analyser la distribution,chez les enzymes isofonctionnels,de sites antigéniques communs avec l'homologue

de référence.A partir de là,ces auteurs ont pu établir des groupes de souches ayant même spécificité antigénique pour un enzyme isofonctionnel et quantifier ensuite les distances immunologiques entre les différents groupes.

Les travaux que nous avons évoqués -qu'ils concernent les eucaryotes ou les procaryotes- portaient sur un enzyme.La question se posait,alors,de savoir si les conclusions taxonomiques et phylogéniques obtenues à partir d'un enzyme isofonctionnel étaient valables pour ce seul enzyme (=un gène) ou si elles pouvaient être généralisées à l'ensemble (totalité du génome) des organismes comparés.

C'est cette question que nous avons posée au début de ce travail en choisissant le groupe des Leuconostoc.Ce choix a été motivé par l'intérêt que porte notre laboratoire à l'étude des bactéries lactiques,par le fait que les différentes espèces du genre Leuconostoc sont mal définies du point de vue taxonomique et,enfin,parce que les travaux antérieurs de Gasser et col. (12) avaient montré que des immuns-sérums anti-D-lactate déshydrogénase de Lactobacillus présentaient des réactivités croisées avec des extraits bruts de Leuconostoc suggérant une origine phylogénique commune de l'enzyme isofonctionnel.

Si nous ouvrons la 8ème édition du Bergey's Manual (1974) à la page 510,nous voyons que le genre Leuconostoc appartient à la tribu des Streptococcae,de la famille des Lactobacteriaceae.Ce sont des cocci,par deux ou en chaînettes,Gram +,immobiles,ne formant pas de spores.Chimioorganotrophes,ils nécessitent des milieux riches et leur culture

dépend de la présence de carbohydrate fermentescible.A partir du glucose,ils produisent de l'acide lactique de type D (-), de l'éthanol et du CO_2.Ils ne possèdent pas de catalase et n'hydrolysent pas l'arginine.Le contenu en G + C des souches types varie de 43 à 44% pour les Leuconostoc lactis et de 38 à 42% pour les autres groupes.

E. Garvie (17,18) distingue deux groupes:
- un premier groupe se développant à pH 5,5 - 6,5 (parmi lequel elle distingue 5 types fermentaires),
- un deuxième groupe se développant à pH 4,2 - 4,8 ou même à pH inférieur.La mobilité électrophorétique des D-lactate déshydrogénases (19) de ces deux groupes est différente.Les limites entre les différents types fermentaires du groupe cultivant à pH 5,5 - 6,5 ne sont pas très nettes comme le montre le tableau Ia.

Cette classification essentiellement basée sur les différences de caractères fermentaires offre un grand intérêt pour l'identification de nouvelles souches mais ne prétend pas refléter l'évolution de ce groupe bactérien.

Pour répondre à la question de la validité de l'étude immunologique comparative d'une seule protéine isofonctionnelle,il fallait comparer les résultats d'au moins deux protéines isolées de la même souche bactérienne.Nous avons choisi pour cela: d'une part,la D-lactate déshydrogénase NAD-dépendante (E.C.:1.1.1.28),d'autre part la glucose-6-phosphate déshydrogénase NAD (P)-dépendante (E.C.:1.1.1.49). Si l'hypothèse dans laquelle l'étude d'une protéine isofonctionnelle reflète l'évolution de la bactérie entière,est vérifiée,on doit s'attendre à retrouver la même image d'évolution pour la totalité du génome.Ceci nous a conduit à déterminer les pourcentages d'hybridation des ADN des souches à

l'étude.Les hybridations ADN-ADN ont été préférées aux hybridations ADN-ARN qui ne s'adressent qu'à une faible partie du génome-gènes codant pour les rARN-dont on sait qu'elle a été fortement conservée au cours de l'évolution (20).

Notre travail a été divisé en trois parties:

- une première partie concerne la purification des enzymes nécessaires à la préparation des immuns-sérums.Nous avons fait une étude biochimique succinte des propriétés des deux enzymes afin de les comparer à d'autres enzymes isofonctionnels bactériens.

- une deuxième partie concerne l'étude immunologique comparative des structures de ces enzymes isofonctionnels : D-lactate déshydrogénase (D-LDH) et glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH).

- la troisième partie concerne la détermination des contenus en G + C des ADN et les taux d'hybridation ADN-ADN.La comparaison des groupes de spécificité immunologique et des groupes d'hybridation doit nous conduire à l'établissement d'une classification naturelle représentant l'état actuel de l'évolution de ce groupe bactérien.

*

* *

Figures in parentheses are the numbers of strains examined in that particular test. Where no figures in parentheses are given all strains were examined. Other figures give the number of strains giving a positive reaction.

	L. cremoris Group I	*L. lactis* Group II	*L. oenos* Group VII	*L. paramesenteroides* Group III	*L. dextranicum* Group IV	*L. dextranicum* Group V	*L. mesenteroides* Group VI
No. of strains examined ...	10	9	19	17	5	16	31
Growth in YGCB*	+ (6)	+ (3)	14	+ (6)	+ (3)	+ (4)	+ (10)
Growth in ATB* better than YGCB	− (6)	− (3)	+	− (6)	− (3)	− (4)	− (10)
Growth in 10% (v/v) ethanol in CMB*	− (2)	− (2)	+	− (2)	− (2)	− (2)	− (2)
Growth at pH 4·8 in CMB	− (6)	− (3)	+	2 (6)	− (2)	− (4)	Slight (10)
Growth at pH 3·7 in CMB	− (2)	− (2)	+	− (2)†	− (2)	− (2)	− (2)
Growth at 37·5°	−	+	15	14	4	+	28
YGLM* reaction acid	+	+	10	17	+	+	+
clot	4	2	−	10	+	15	27
reduction	1	2 (slight)	2	2	+	12	26
gas	1	−	−	2	1	7	14
Dextran synthesis	−	−	−	−	+	+	+
Dissimilation of citrate	+ (6)	1 (5)	18	1 (8)	1 (13)		2 (11)
Acid from arabinose	−	1	9	16	−	−	+
xylose	−	−	3	5	−	+	24
fructose	−	7	+	16	+	14	30
glucose	+	+	+	+	+	+	+
galactose	+	+	4	+	3	13	29
mannose	−	8	11	+	+	15	30
cellobiose	−	−	13	7	−	3	19
lactose	+	+	−	5	2	10	16
maltose	−	+	−	16	3	+	29
sucrose	−	8	−	15	4	+	+
trehalose	−	1	+	+	+	+	+
melibiose	−	8	14	+	−	15	25
raffinose	−	3	−	7	−	9	16
dextrin	−	−	−	6	−	−	−
aesculin	−	−	+	7	−	8	29
salicin	−	−	14	−	−	3	24
mannitol	−	−	−	7	−	3	11

† The two strains which grow at pH 4·8.

* YGCB = yeast glucose citrate broth; ATB = acidic tomato broth; CMB = citric-malic acid broth; YGLM = glucose litmus milk.

Tableau Ia : Caractères différentiels des espèces de Leuconostoc décrites par Garvie (18).

C H A P I T R E I

PURIFICATION DE LA D-LACTATE DESHYDROGENASE ET DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE DE LEUCONOSTOC LACTIS NCDO 546 ET DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE DE LEUCONOSTOC MESENTEROIDES NCDO 768

L'obtention de protéines enzymatiques pures était la première étape de notre travail, en vue de la préparation d'immuns-sérums spécifiques. Au cours d'essais préliminaires, la possibilité de séparer deux enzymes : la D-lactate déshydrogénase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase, à partir d'un même extrait brut de Leuconostoc lactis NCDO 546, s'est rapidement manifestée. La purification de chaque enzyme a été poursuivie séparément. La glucose-6-phosphate déshydrogénase de la souche de Leuconostoc mesenteroides ATCC 12291, nous a été fournie, partiellement purifiée, par les laboratoires Sigma. Nous l'avons amenée au degré de pureté nécessaire à l'utilisation immunologique.

I. MATERIEL ET METHODES

1. - Souches.

La souche de Leuconostoc lactis, dont sont extraits la D-lactate déshydrogénase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase est la souche NCDO 546 provenant de la National Collection of Dairy Organisms, Reading, Angleterre.

La souche de Leuconostoc mesenteroides ATCC 12291 (American Type Culture Collection) est identique à la souche NCDO 768.

2. - Milieu et conditions de culture.

2.1. Milieu de culture.

La composition du milieu de culture est la suivante : Tryptone Difco : 5 g ; Extrait de levure Difco : 5 g; $MgSO_4$, 7 H_2O : 0,2 g ; $MnSO_4$, H_2O : 0,05 g ; HK_2PO_4 : 2 g ; H_2KPO_4 : 1,6 g ; eau déminéralisée q.s.p. 1.000 ml. Le pH est ajusté à 6,5 ; la stérilisation se fait à 120°C pendant 20 minutes. Au moment de la culture, on ajoute 15 g/l de glucose stérile.

2.2. Conditions de culture.

Les cultures sont faites à 30°C, en aérobiose, dans un fermenteur (Biolafitte) de 15 litres ensemencé avec 500 ml de préculture agitée pendant 18 heures dans des fioles de Fernbach de 2 litres. Le débit d'air du fermenteur est réglé à 500 ml/mn/l et l'agitation à 600 t/mn. Cinq fermenteurs ont permis de récolter 150 g de bactéries (poids humide) recueillies en fin de phase exponentielle de croissance, par centrifugation continue.

3. - Préparation de l'extrait brut.

Elle est effectuée à + 4°C.

Les cellules bactériennes sont lavées deux fois en tampon phosphate (Na_2/ K) 50 mM, pH 7, puis remises en suspension dans ce même tampon à raison de 100 mg de cellules (poids humide) par ml. Elles sont ensuite soumises à l'action des ultra-sons pendant 20 mn (Branson Sonifier type B 12). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 31.000 g pendant 20 mn ; le surnageant constitue l'extrait brut.

4. - Dosages.

4.1. Dosages des protéines.

Au cours des étapes initiales et finales de la purification, les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry (21).

Au cours de la purification, lorsque le rapport $\frac{A\ 280}{A\ 260}$ est > 1, la concentration en protéines a été estimée par l'équation de Warburg et Christian (22) :

$$(DO._{280\ nm} \times 1,5) - (DO._{260\ nm} \times 0,75) = \text{mg de protéines/ml}$$

4.2. Dosages des activités enzymatiques.

4.2.1. Activité D-lactate déshydrogénase.

L'activité D-lactate déshydrogénase est mesurée dans le sens de la déshydrogénation du lactate par la vitesse initiale de réduction à 340 nm du NAD 2 mM, en présence de D-lactate de sodium 100 mM dans du tampon Tris-HCl 16 mM, pH 8, à 30°C.

Une unité d'activité enzymatique correspond à la réduction d'une micromole de NAD par minute.

4.2.2. Activité glucose-6-phosphate déshydrogénase.

L'activité glucose-6-phosphate déshydrogénase est mesurée par la vitesse initiale de réduction à 340 nm du NAD 2 mM, en présence de glucose-6-phosphate (sel sodique) 10 mM et de $MgCl_2$ 2,4 mM dans du tampon Tris-HCl 14,4 mM, pH 8, à 30°C.

Une unité d'activité enzymatique correspond à la réduction d'une micromole de NAD par minute.

Les activités spécifiquesreprésentent les activités par mg de protéines.

5. - Chromatographies.

5.1. Chromatographie sur hydroxylapatite.

L'hydroxylapatite en poudre (Biogel HTP) est mise en suspension dans 10 fois son volume de tampon phosphate (Na_2/K) 20 mM, pH 7, additionné de dithiothréitol 1 mM. Après élimination des particules fines et dégazage sous vide, la suspension est versée dans une colonne Pharmacia (5 cm x 60 cm). L'élution est effectuée par passages successifs de tampons phosphate, pH 7 + dithiothréitol 1 mM, de molarités croissantes : 20, 30, 60 et 90 mM. Les fractions récoltées sont de 10 ml et le volume de chaque tampon est déterminé par le profil d'absorption à 280 nm de l'éluat, enregistré sur Elugraphe Seive.

5.2. Chromatographie sur DEAE-Cellulose.

La DEAE-Cellulose en poudre (Cellex D, Bio-Rad) est activée suivant la méthode décrite par Peterson et Sober (23) puis équilibrée dans le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 + dithiothréitol 1 mM + EDTA 1 mM. La suspension est placée dans une colonne Pharmacia (2,5 x 45 cm). L'élution est effectuée par un gradient discontinu de NaCl dans le même tampon. Les fractions récoltées sont de 3 ml.

6. - Electrophorèses en gel de polyacrylamide.

6.1. Electrophorèse analytique.

La méthode décrite par Davis (24) a été utilisée pour contrôler la pureté des différentes fractions. L'appareil utilisé est le polyanalyst Buchler ; le pH du tampon d'électrophorèse est de 8,9. Les tubes pour le contrôle de la pureté des enzymes sont chargés avec 120 à 200 µg de protéines ; ils seront colorés par le bleu decoomassie suivant la méthode de

Chrambach et col. (25). Les tubes destinés à la localisation de l'activité enzymatique contiennent 0,05 unité d'activité enzymatique ; cette activité est révélée par la méthode de Fine et Costello modifiée (26) avec les mélanges suivants :

- pour la D-LDH : D-lactate de sodium : 100 mM ; NAD : 0,6 mM ; nitro-bleu-tetrazolium : 0,5 mM ; phénazine méthosulfate : 0,1 mM ; dans du tampon Tris-HCl 17,5 mM, pH 8 pour un volume final de 4 ml.

- pour la G-6-P-DH : le D-lactate de sodium est remplacé par du glucose-6-phosphate 10 mM.

Les réactions sont arrêtées en transférant les gels dans de l'acide acétique à 7 %.

6.2. Electrophorèse préparative.

Les électrophorèses préparatives ont été réalisées dans un appareil E.C. Apparatus décrit originellement par Raymond (27), selon la méthode de London (communication personnelle). Le gel de séparation contient 7 % de cyanogum 41 (Gelling agent - E.C. Apparatus Corporation) dans du tampon Tris-HCl, pH 8,9 tandis que le gel de concentration est à 4 % de cyanogum en tampon Tris-phosphate, pH 6,7. Le tampon d'électrophorèse est du tampon Tris-glycine, pH 8,4.

Une pré-électrophorèse, sans protéine, est conduite dans le but d'éliminer l'excès de persulfate d'ammonium et de diminuer le dégagement de chaleur : l'intensité décroit alors de 120 à 50 mA pour un voltage constant de 120 V. L'échantillon, additionné de saccharose cristallisé et de bleu de bromophénol en poudre (marqueur de migration), est alors déposé dans la rainure du gel de concentration et soumis à l'électrophorèse pendant 16 heures, sous un voltage constant de 120 V.

L'activité enzymatique est localisée par la coloration spécifique sur une bande de gel d'environ 0,5 cm. découpée longitudinalement sur la plaque de migration. La bande transversale contenant l'enzyme est découpée et broyée au froid, puis placée au congélateur à -30°C pendant cinq heures. On ajoute alors 5 ml de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 + EDTA 1 mM ; après agitation vigoureuse, la suspension est laissée en contact 1 h 30 à 0°C. Le polyacrylamide est éliminé par centrifugation à 35.000 g pendant 20 minutes et le surnageant contenant l'activité enzymatique est recueilli.

II. RESULTATS

1. - Séparation des deux enzymes.

Toutes les étapes de purification se font à +4°C.

L'extrait brut est dialysé pendant 24 heures contre du tampon phosphate Na_2/K 1,6 mM, pH 7, renouvelé quatre fois. Les acides nucléiques sont précipités par le sulfate de streptomycine suivant la méthode d'Oxenburgh et Snoswell (28), et éliminés par centrifugation à 18.000 g pendant 30 minutes. Le surnageant est recueilli.

La concentration en phosphate du tampon est relevée à 20 mM et du dithiothréitol nécessaire à la stabilité de la D-LDH est additionné à la concentration de 1 mM. Du sulfate d'ammonium cristallisé est ajouté par petites fractions à la solution protéique jusqu'à obtenir 95 % de saturation. Après une nuit de repos, le mélange est centrifugé à 16.000 g pendant 40 minutes.

Le culot est repris dans 150 ml de tampon phosphate Na_2/K 20 mM + dithiothréitol 1 mM, pH 7 et dialysé contre ce même tampon renouvelé quatre fois.

Le dialysat obtenu est déposé à la surface d'une colonne d'hydroxylapatite équilibrée en tampon phosphate 20 mM, pH 7 + dithiothréitol 1 mM. La D-LDH est éluée par le tampon 30 mM et la G-6-PDH par le tampon 90 mM (Voir Méthodes).

Le profil d'élution est donné par la Figure 1.

2. - Purification de la D-lactate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546.

2.1. Chromatographie sur DEAE-Cellulose.

Comme nous désirions obtenir un enzyme le plus pur possible, nous avons divisé l'éluat de la colonne d'hydroxylapatite, contenant l'activité D-LDH, en deux fractions selon leur activité spécifique :

HA D1 = tubes 74 - 78, d'activité spécifique moyenne 112,

HA D2 = tubes 66 - 73 et 79 - 85, d'activité spécifique moyenne 71.

Ces deux fractions sont respectivement précipitées au sulfate d'ammonium jusqu'à 95 % de saturation ; les culots sont dialysés contre du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 + dithiothréitol 1 mM + EDTA 1 mM.

Les dialysats sont déposés sur deux colonnes de DEAE-Cellulose dont l'élution est faite, en cinq étapes, par un gradient discontinu de NaCl de 0,14 M à 0,30 M. L'activité D-LDH est éluée pour une concentration de NaCl = 0,26 M.

Le pool HA D1 fournit un pic d'activité CD I dont seuls les tubes présentant la meilleure activité spécifique sont gardés. Le pool HA D2 fournit deux fractions CD II et

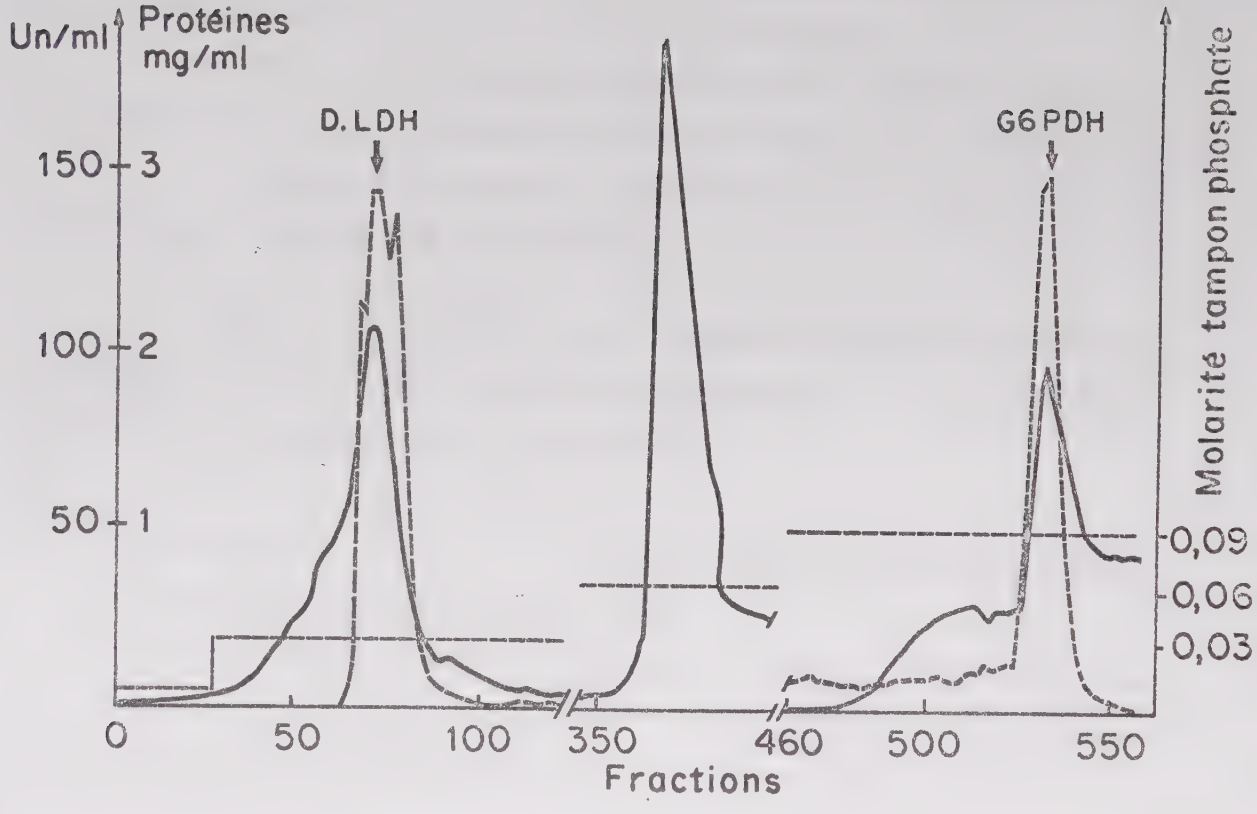


Figure 1 : Séparation de la D-LDH et de la G-6-PDH sur gel d'hydroxylapatite
Profil d'élution avec les tampons phosphate Na_2/K, pH 7, de molarités croissantes, additionnés de dithiothréitol 1 mM.
(Colonne Pharmacia : 5 x 60 cm; débit 120 ml/h; fractions : 10 ml)

———— Protéines mg/ml
– – – – – Unités D-LDH/ml
-------- Unités G-6-PDH/ml

CD III prises sur le même pic d'élution mais présentant des activités spécifiques inégales (Tableau I).

2.2. Contrôle de la pureté.

La pureté des fractions CD I, CD II et CD III a été contrôlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Deux échantillons sont examinés en parallèle :

- l'un contenant 120 µg, destiné à observer le nombre de bandes protéiques colorables par le bleu de coomassie,
- l'autre contenant 0,05 unité d'activité, destiné à localiser l'activité enzymatique.

Seule, la fraction CD I montre une seule bande de protéine colorable par le bleu de coomassie et correspondant à l'activité enzymatique (Figure 2).

3. - Purification de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546.

L'ensemble des fractions à activité G-6-PDH provenant de l'élution de la colonne d'hydroxylapatite a été rassemblé en deux pools d'après leur activité spécifique :

HA G1 = tubes 484 - 536, d'activité spécifique moyenne 82.

HA G2 = tubes 468 - 483 et 537 - 550, d'activité spécifique moyenne 35.

Chaque pool est concentré sur membrane ultrafiltrante DIAFLO PM 10 et conservé à -30°C (sans diminution de l'activité spécifique) pendant la purification de la D-LDH.

Après décongélation, ces pools sont dialysés contre du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 + EDTA 1 mM puis déposés sur deux colonnes de DEAE-Cellulose équilibrée dans ce même tampon. L'élution est pratiquée avec un gradient discontinu de

Figure 2 : Electrophorèse analytique en gel de polyacrylamide, à pH 8,9, de la fraction CD I, provenant de l'élution de la colonne de DEAE-Cellulose.
A : Après coloration des protéines (120 µg protéines)
B : Après révélation de l'activité D-LDH (0,05 unité d'activité enzymatique).

NaCl de 0,10 à 0,20 M en cinq étapes. La glucose-6-phosphate déshydrogénase est éluée à 0,18 M de NaCl.

A partir de HA G1 nous avons obtenu un pic C GI et à partir de HA G2 un pic CGII. L'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide a montré que C G1 et CG II contenaient, l'un et l'autre, des bandes mineures de protéines contaminantes.

Des essais de fractionnement par précipitation au sulfate d'ammonium, par filtration sur Sephadex G.100 et G.200 ou par chromatographie d'échange sur QAE-Sephadex n'ont pu aboutir à l'élimination de ces bandes mineures.

Nous avons alors pratiqué des électrophorèses préparatives sur gel d'acrylamide. L'échantillon déposé est de 9 mg de protéines (fraction C GI). La fraction active recueillie correspond à 60 % de l'activité déposée sur le gel.

Après concentration sur membrane DIAFLO PM10, un contrôle est effectué en électrophorèse analytique. Une bande unique de protéine correspondant à la bande d'activité G-6-PDH est révélée par le bleu de coomassie.

4. - Purification de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768 (=ATCC 12291).

La glucose-6-phosphate déshydrogénase commerciale (G-6-PDH de Leuconostoc mesenteroides, Sigma, réf. G.2256) est présentée sous forme de suspension dans une solution de sulfate d'ammonium 3,5 M à la concentration de 100 unités par mg de protéine (activité mesurée en présence de NADP).

Une électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide de cet enzyme commercial montre la présence d'une bande majeure correspondant à l'activité G-6-PDH, d'une bande à migration plus rapide assez importante et de 4 bandes mineures.

4.000 unités (activité mesurée avec NAD) correspondant à 10,5 mg de protéines ont été purifiées par électropho-

TABLEAU I : Séparation et purification de la D-lactate déshydrogénase et de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase de *Leuconostoc lactis*.

Etapes	$\frac{280}{260}$	Volume total ml	Protéines totales mg	Unités totales D-LDH	Activité spécifique D-LDH	Rendement D-LDH	Unités totales G-6-PDH	Activité spécifique G-6-PDH	Rendement G-6-PDH
Extrait brut	0,46	1.730	11.237	26.746	2,38	100%	29.520	2,63	100%
Surnageant après précipitation par streptomycine	0,63	2.100	2.677	26.880	10	100%	26.200	9,8	90%
Dialysat après précipitation totale au $(NH_4)_2\ SO_4$	1,16	242	2.646	26.504	10	98%	26.030	9,8	88%
Hydroxylapatite									
HA D1	1,85	10	40,5	4.560	112,5	} 58%	———	———	———
HA D2	1,6	18	152,5	10.944	71,5		———	———	———
HA G1	1,5	81	164	———	———	———	13.500	82,3	} 72%
HA G2	1,4	98	224	———	———	———	7.840	35	
DEAE-Cellulose									
HA D1 → C DI	1,85	2,8	6,9	1.635	235				
HA D2 → C DII	1,7	5,6	21,8	4.972	227	} 32%	———	———	———
HA D2 → C DIII	1,8	26	16	2.038	126,6		———	———	———
HA G1 → C GI	1,87	18	27	———	———	———	8.300	307	} 43%
HA G2 → C GII	1,8	8	15,6	———	———	———	4.410	282,6	

rèse préparative en gel de polyacrylamide après dialyse contre du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8 + EDTA 1 mM.

Une fraction correspondant à 51 % de l'activité mise sur le gel et ne présentant plus qu'une seule bande en électrophorèse analytique a été récupérée.

III. DISCUSSION

L'utilisation de l'hydroxylapatite comme support de chromatographie nous a permis de séparer, en une seule étape, à partir d'un même extrait brut, les deux enzymes que nous avions choisis de purifier.

L'obtention d'une seule bande de protéine en électrophorèse en gel d'acrylamide était notre but. Nous y sommes parvenus en utilisant la chromatographie sur DEAE-Cellulose pour la D-LDH ; pour la G-6-PDH, il a été nécessaire de pratiquer des électrophorèses préparatives en gel d'acrylamide que ce soit pour la G-6-PDH de la souche 546 ou pour celle de l'enzyme commercial de la souche 768.

Les fractions pures seront ultérieurement utilisées pour la préparation d'immuns-sérums. La pureté immunologique sera contrôlée, pour chaque protéine, par immunoélectrophorèse et confirmée par l'obtention d'une seule ligne de précipité aussi bien en présence de l'extrait brut que de la fraction purifiée.

Les résultats de la purification de la D-LDH et de la G-6-PDH de Leuconostoc lactis NCDO 546 sont présentés dans le Tableau I.

C H A P I T R E I I

ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DE LA D-LACTATE DESHYDROGENASE ET DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE DE LEUCONOSTOC LACTIS

L'étude comparative des propriétés des enzymes isofonctionnels chez les bactéries peut fournir des informations complémentaires sur leur parenté éventuelle. Lorsque nous avons commencé ce travail, seule la G-6-PDH de Leuconostoc mesenteroïdes avait été étudiée de manière approfondie par Lévy et Olive (29). Les D-LDH des Leuconostoc n'avaient pas fait l'objet d'une étude biochimique mais on savait qu'elles donnaient des réactions immunologiques croisées avec les D-LDH des Lactobacillus (12). En 1973, au moment où nos résultats sur la D-LDH de Leuconostoc lactis étaient publiés (30), R. Garland présentait les propriétés de la D-LDH de Leuconostoc mesenteroïdes (31).

Nous donnerons ici les résultats de l'étude de quelques propriétés caractéristiques de la D-LDH et de la G-6-PDH de Leuconostoc lactis. En conclusion, nous comparerons nos résultats à ceux de la littérature concernant ces deux enzymes chez les Procaryotes.

I. MATERIEL ET METHODES

1. - Dosages enzymatiques.

1.1. Activité D-lactate déshydrogénase.

L'activité D-lactate déshydrogénase a été mesurée dans le sens de la réduction du pyruvate par la vitesse initiale d'oxydation à 340 nm du NADH 2 mM en présence de pyruvate de sodium 20 mM dans du tampon Tris-HCl 16 mM, pH 7,6, à 30°C.

Les conditions de mesure de l'activité dans le sens de l'oxydation du D-lactate ont été données dans le Chapitre I.

1.2. Activité glucose-6-phosphate déshydrogénase.

L'activité glucose-6-phosphate déshydrogénase a été mesurée dans les conditions énoncées au Chapitre I, par la mesure de la vitesse initiale de la réduction à 340 nm soit du NAD 2 mM, soit du NADP 0,2 mM.

2. - Détermination de la masse moléculaire.

2.1. Filtration sur Sephadex G-200.

La masse moléculaire des enzymes a été estimée par filtration sur Sephadex G-200 (Colonne Pharmacia 0,9 x 60 cm) en tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 + NaCl 0,1 M.

A la surface du gel, on dépose 0,25 mg de l'enzyme et le mélange des marqueurs suivants : Cytochrome c (MM : 12.400) 5 mg ; phosphatase alcaline d'E. coli (MM : 80.000) : 0,5 mg ; L-LDH de coeur de boeuf (MM : 140.000) : 0,5 mg ; ferritine (MM : 540.000, marqueur d'exclusion) : 2,5 mg.

Le tampon d'élution est du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 + NaCl 0,1 M.

2.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide + dodécylsulfate de sodium (SDS).

La méthode de Shapiro, Viñuela et Maïzel (32) a été utilisée pour la D-LDH. La courbe de référence a été établie avec les marqueurs suivants : lysozyme (MM : 13.800), trypsine (MM : 24.500), pepsine (MM : 37.500), ovalbumine (MM : 46.500), sérum albumine bovine (MM du monomère : 62.000), L-LDH de coeur de boeuf (MM du monomère : 35.000).

Les gels contiennent 5 % de polyacrylamide; l'intensité est de 8 mA par tube,

La concentration en SDS est de 0,1 %. Les échantillons additionnés de 0,1 % de β-mercaptoéthanol sont portés au bain-marie à 37°C pendant 3 heures. L'électrophorèse est pratiquée en tampon phosphate (Na), pH 7,2.

Après migration, les gels sont fixés à l'acide sulfosalicylique à 20 % pendant 16 heures puis colorés pendant 5 heures par le bleu de coomassie à 0,25 %. L'excès de colorant est éliminé par l'acide acétique à 7 %.

II. RESULTATS

1. - Propriétés de la D-lactate déshydrogénase de Leuconostoc lactis.

1.1. Etude de l'activité en fonction du pH.

L'activité enzymatique de la fraction CD I est mesurée en vitesse initiale dans différents tampons, pour différentes valeurs de pH.

La figure 3 donne les résultats obtenus pour les deux réactions, celle d'oxydation du NADH et celle de réduction du NAD.

Dans le sens pyruvate → D-lactate, le pH optimum est de 7,6.

Dans le sens D-lactate → pyruvate, le pH optimum est de 8.

1.2. Cinétiques de l'activité D-lactate déshydrogénase en fonction de la concentration en substrats.

L'influence des différentes concentrations de substrats : pyruvate, NADH, D-lactate et NAD, sur l'activité enzymatique de la D-LDH a été étudiée sur la fraction CD I, au

pH optimal de chaque réaction.

Le Tableau II donne les résultats concernant la variation de l'activité enzymatique en fonction de concentrations variables de NAD et cela pour différentes concentrations de D-lactate.

La figure 4 représente, dans les coordonnées de Lineweaver et Burk (33), les variations de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en NAD. Les différentes droites de cette figure sont obtenues pour des concentrations variables de D-lactate.

Dans un graphique secondaire, on porte les intersections $\frac{1}{V_{NAD}}$ en fonction des concentrations de D-lactate (figure 4 bis). La droite obtenue coupe l'axe des abscisses à $-\frac{1}{Km\ lactate}$ et l'axe des ordonnées à $\frac{1}{V_{max}}$.

Nous avons pu, par cette méthode, déterminer les valeurs suivantes :

Km pyruvate = 2 mM

Km NADH = 0,22 mM

Activité molaire spécifique: $6,6\ 10^{6}$ moles NADH sec^{-1}

Km D-lactate = 50 mM

Km NAD = 12,5 mM

Activité molaire spécifique: $6,4\ 10^{5}$ moles NAD sec^{-1}

1.3. Stabilité de la D-lactate déshydrogénase.

1.3.1. Stabilité vis-à-vis de la chaleur.

1.3.1.1. En fonction de la température.

La fraction CD I est diluée au 1/100ème dans du tampon Tris-HCl 20 mM préalablement chauffé à la tempé-

TABLEAU II : Activité de la D-lactate-déshydrogénase pour différentes concentrations de D-lactate en fonction de la concentration en NAD.

Concentration en D-lactate		200 mM		100 mM		80 mM		50 mM	
Concentration en NAD									
NAD	$\frac{1}{NAD}\ 10^2$	V	$\frac{1}{V}\ 10^2$	V	$\frac{1}{V}\ 10^2$	V	$\frac{1}{V}\ 10^2$	V	$\frac{1}{V}\ 10^2$
4	25	14,4	7,0	13,6	7,3	9,6	10,6	6,4	15,6
8	12,5	24	4,2	22,4	4,4	16,8	5,9	11,2	8,9
12	8	30,4	3,3	27,2	3,6	20,8	4,8	14,4	7,0
16	6	34,4	2,9	29,6	3,3	24,8	4	18,4	5,4
20	5	36,8	2,7	32	3,1	26,4	3,8	19,2	5,2
30	3,3	40,8	2,4	36,8	2,7	30,4	3,3	23,2	4,3
40	2,5	41,6	2,3	39,2	2,5	35,2	2,8	24	4,1

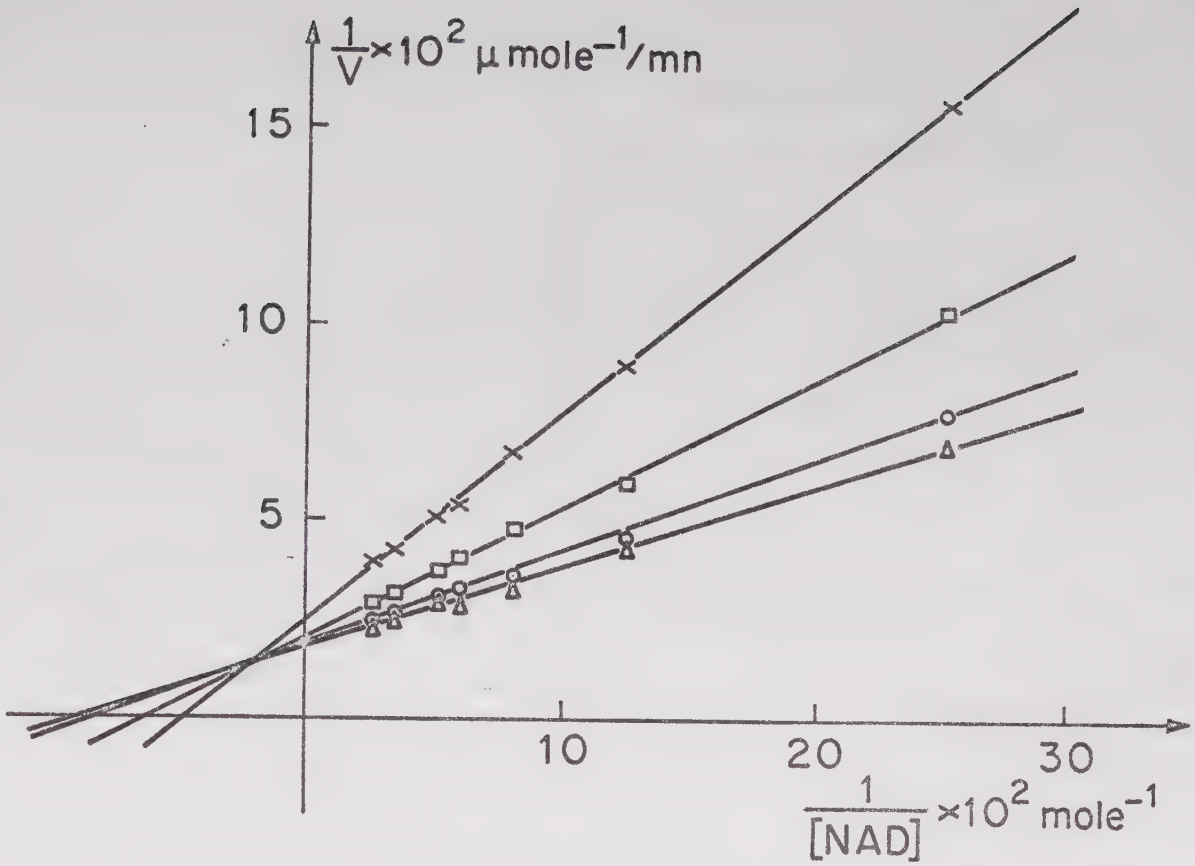


Figure 4 : Représentation en coordonnées de Lineweaver et Burk, des vitesses initiales en fonction de la concentration en NAD, pour différentes concentrations D-lactate :

△——△ : D-lactate [200 mM]

○——○ : D-lactate [100 mM]

□——□ : D-lactate [80 mM]

×——× : D-lactate [50 mM]

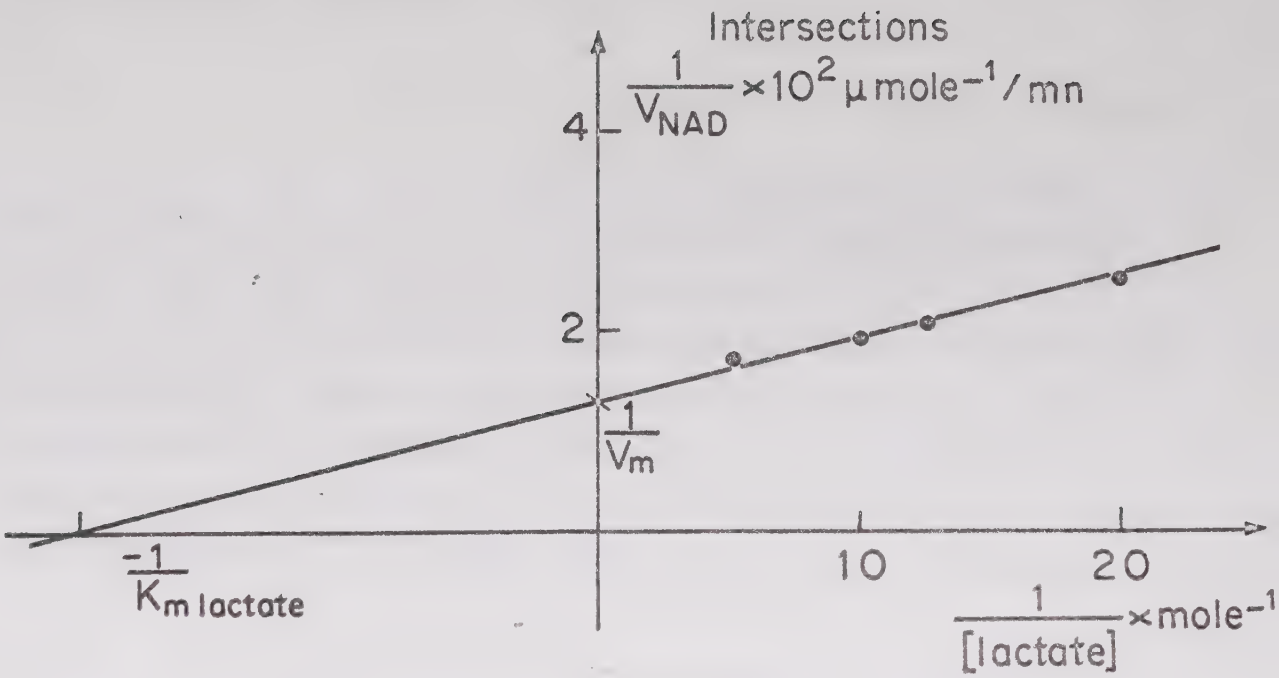


Figure 4bis : Graphique secondaire des intersections $\frac{1}{V_{NAD}}$ (Figure 4) en fonction des inverses des différentes concentrations de D-lactate.

rature désirée (30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C). Après une incubation de 5 minutes, le tube est plongé dans la glace et l'activité résiduelle est mesurée immédiatement (en présence de pyruvate et de NADH).

Les résultats représentés par la figure 5 montrent la grande thermosensibilité de l'enzyme (perte de 98 % de l'activité par chauffage 5 minutes à 45°C).

1.3.1.2. En fonction du temps de chauffage.

L'activité de la fraction CD I diluée est mesurée après incubation, pendant des temps variables, à 37°C d'une part et à 42°C d'autre part.

Le logarithme du pourcentage d'activité résiduelle en fonction du temps -figure 6- est une droite pour chaque température. Cela montre que la fraction purifiée contient une espèce protéique unique à activité D-LDH. A 42°C, l'activité enzymatique est perdue après 20 minutes de chauffage.

1.3.1.3. Protection de l'activité enzymatique par les substrats.

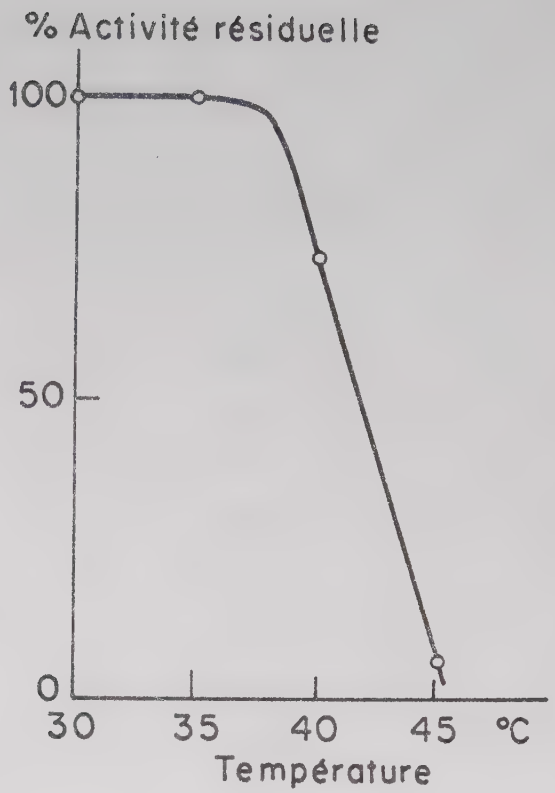
Si on incube l'enzyme pendant des temps variables à 42°C en présence soit de D-lactate 10 mM, soit de NAD 0,5 mM, on obtient une protection thermique comme le montre la figure 6.

1.4. Action du p. chloromercuribenzoate.

La présence de radicaux sulfhydriles intacts semble nécessaire à l'activité de la D-LDH. Lorsqu'on incube l'enzyme en présence de concentrations variables de pCMB à 25°C, on observe une inhibition de l'activité (tableau III).

Ce résultat est en accord avec la protection observée par le dithiothréitol et suggère la présence de groupements

Figure 5 : Inactivation de la D-LDH par la chaleur. L'enzyme est incubé 5 mn dans du tampon Tris-HCl 20 mM à la température désirée et son activitée mesurée à 30°C.



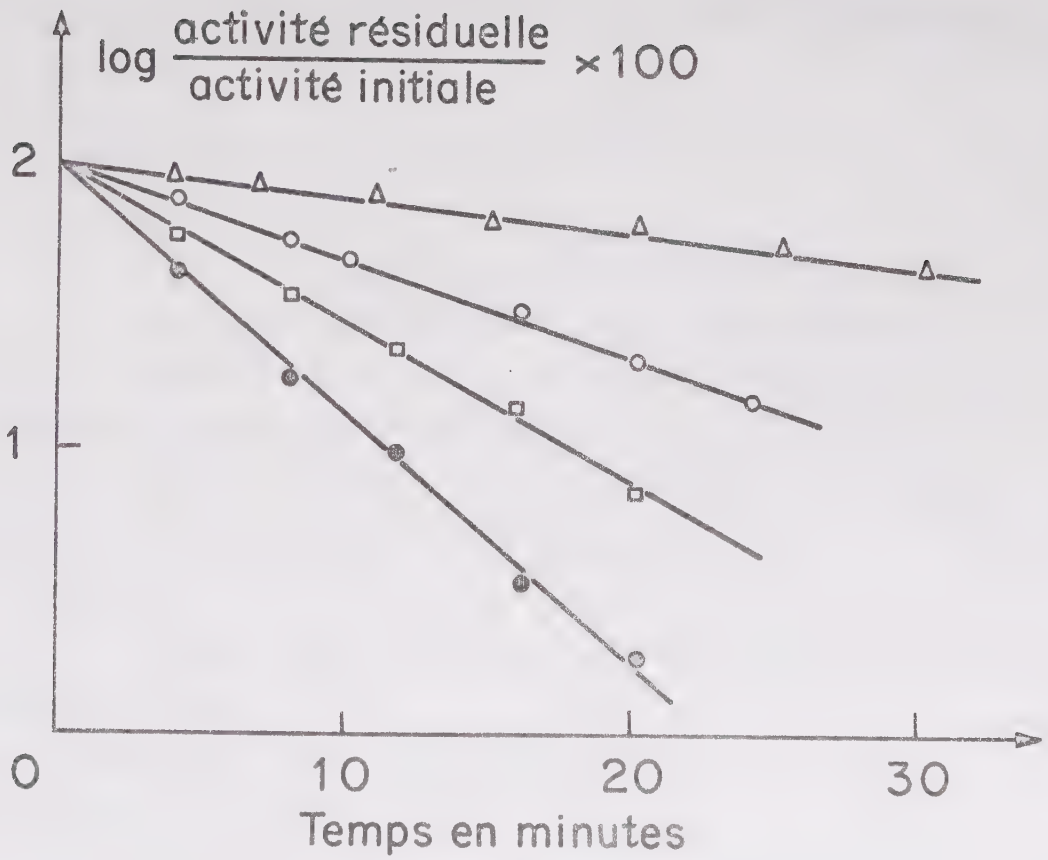


Figure 6 : Inactivation de la D-LDH en fonction du temps de chauffage, à 37°C et à 42°C en présence ou non des substrats (Δ—Δ : 37°C, sans addition, ○—○ : 42°C, sans addition, ○—○ : 42°C + D-lactate 10 mM; □—□ : 42°C + NAD : 0,5 mM).

SH dans la molécule.

Molarité p.CMB mM	% d'activité D-LDH
0	100
0,01	93
0,02	87
0,05	82
0,08	62
0,1	57
0,5	20,5
0,8	6,2
1	0

Tableau III : Action du p. chloromercuribenzoate sur l'activité de la D-LDH de Leuconostoc lactis.

1.5. Détermination de la masse moléculaire.

1.5.1. Filtration sur Sephadex G-200.

La D-LDH est éluée selon un pic recouvrant celui de la phosphatase alcaline. La masse moléculaire peut être estimée graphiquement à 80.000 daltons.

La figure 7 représente le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume élué.

1.5.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

L'appareil utilisé est le Polyanalyst Buchler ; l'électrophorèse se pratique à la température du laboratoire.

La D-LDH de Leuconostoc lactis ne donne qu'une seule bande colorée par le bleu de coomassie. La courbe représentant le logarithme de la masse moléculaire en fonction de

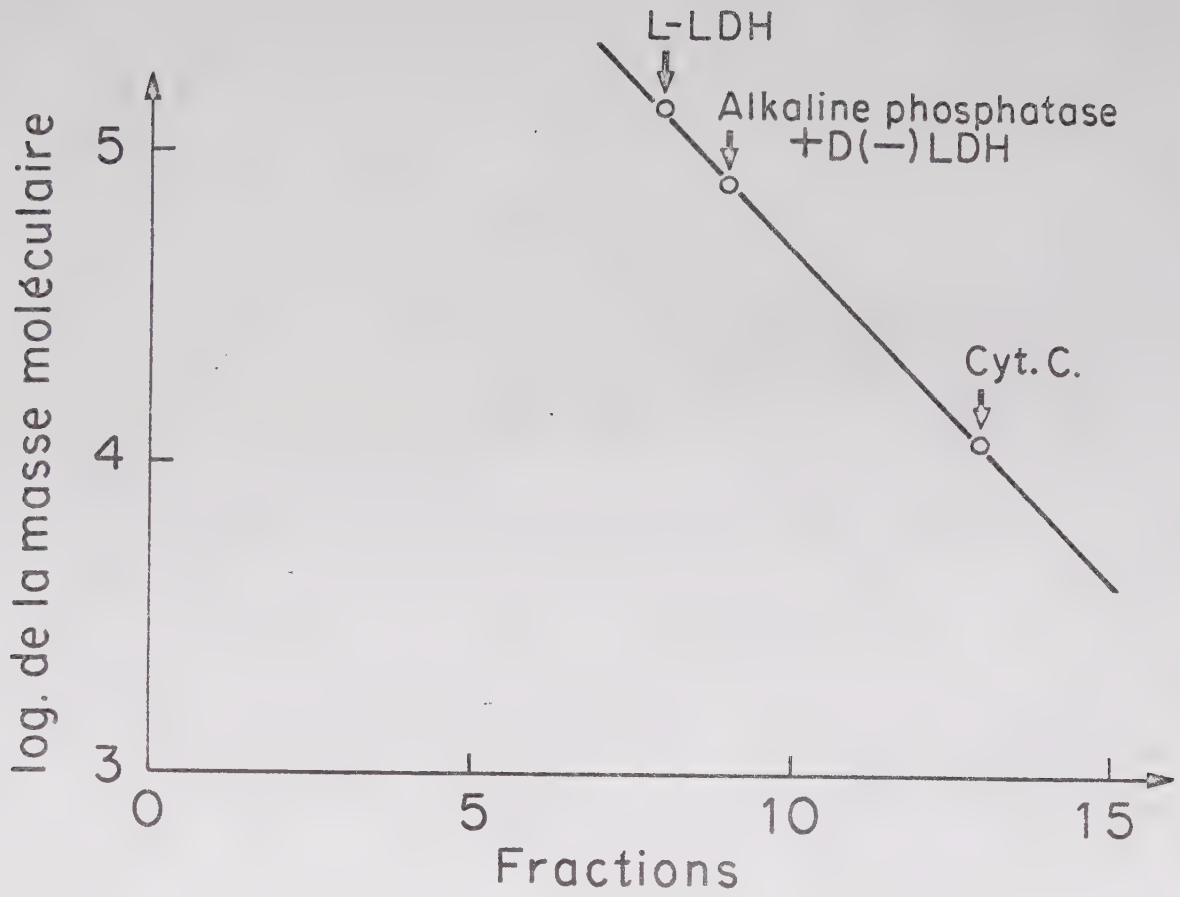


Figure 7 : Détermination de la masse moléculaire de la D-LDH par filtration sur Sephadex G-200, en tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 + NaCl 0,1 M : Représentation du logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume élué.

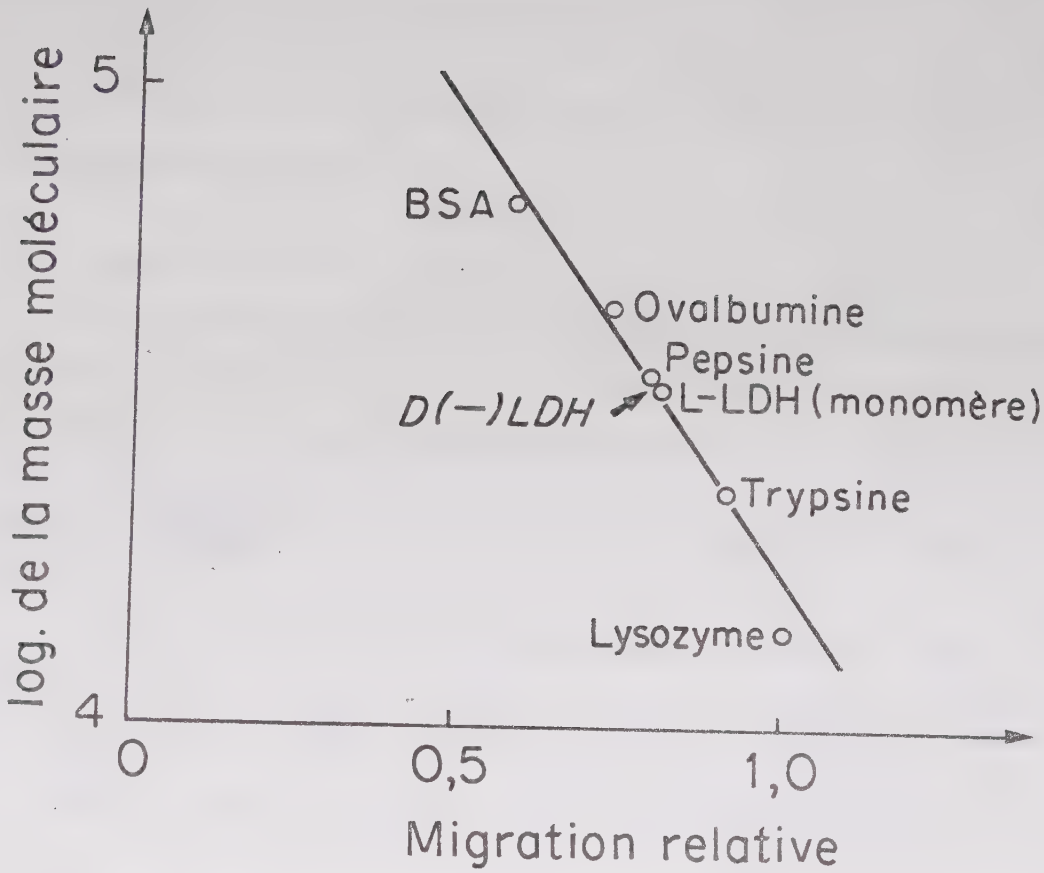


Figure 8 : Détermination de la masse moléculaire de la D-LDH par électrophorèse en gel de polyacrylamide + SDS : Représentation de la masse moléculaire en fonction de la migration relative des différents marqueurs et de la D-LDH.

la migration relative est tracée, figure 8. La détermination graphique donne une valeur de 34.600 daltons. En comparant avec le résultat obtenu par filtration sur gel, il est permis de penser que la D-LDH de Leuconostoc lactis est composée de deux sous-unités identiques.

2. - Propriétés de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis.

2.1. Spécificité du coenzyme.

La glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis utilise comme coenzyme soit le NAD, soit le NADP. Le rapport des vitesses initiales mesurées au pH optimum de chaque réaction $\frac{ViNAD}{ViNADP}$, sur la fraction purifiée, est de 1,83.

Après électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide l'activité enzymatique révélée en présence de NAD plus NADP donne une seule bande colorée que ce soit sur un extrait brut ou sur une fraction purifiée de l'enzyme.

2.2. Etude de l'activité en fonction du pH.

L'activité enzymatique de la fraction GD I est mesurée dans les tampons suivants :

- Tris-maléate (Tris 0,2 M et maléate 0,2 M) de pH 5,2 à 8,6.
- Glycine - NaOH 0,2 M de pH 8,6 à 10,4.

Le pH optimum d'activité a été déterminé pour la réaction liée au NAD et pour celle liée au NADP. Les résultats sont donnés par la figure 9.

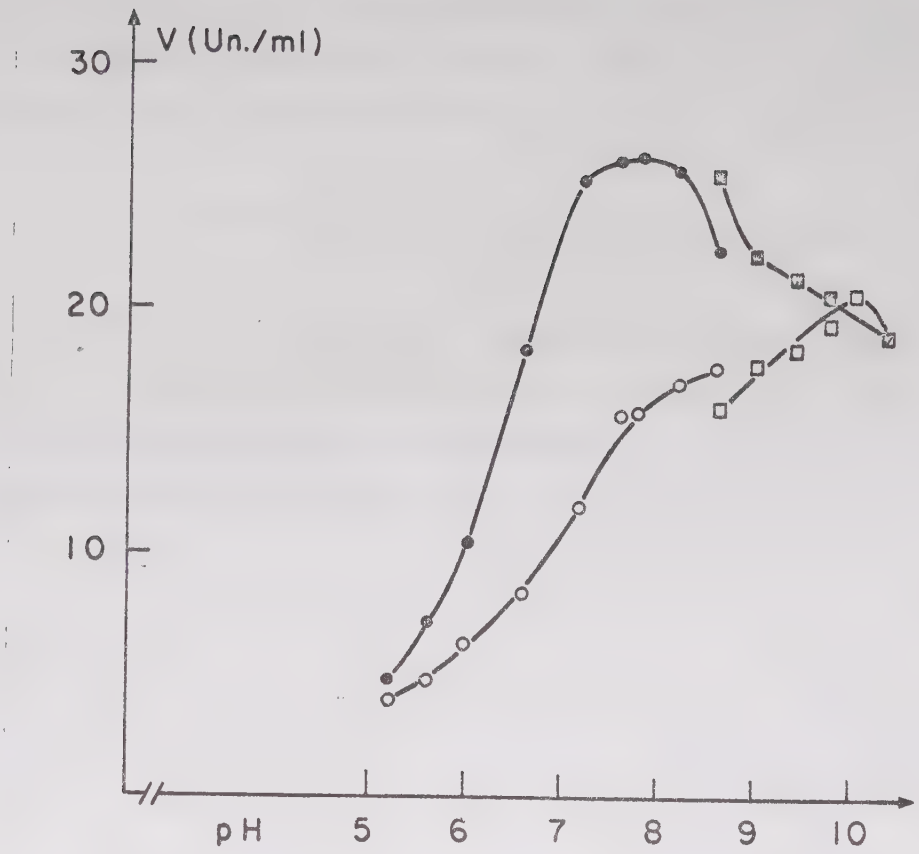


Figure 9 : Variations de l'activité de la G-6-PDH en fonction du pH.

○——○ et □——□ : Réaction liée au NAD.

○——○ et □——□ : Réaction liée au NADP.

●——● et ○——○ : tris-maléate 0,2 M, pH 5,2 à 8,6.

■——■ et □——□ : Glycine-NaOH 0,2 M, pH 8,6 à 10,4.

- Le pH optimum de la réaction liée au NAD est de 7,8.
- Le pH optimum de la réaction liée au NADP est de 10.

2.3. Cinétiques de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase en fonction de la concentration en substrats.

L'influence de la concentration des différents substrats : glucose-6-phosphate, NAD et NADP a été étudiée sur la fraction CG I, au pH optimal de chaque réaction.

2.3.1. Concentrations variables de glucose-6-phosphate.

Le NAD est utilisé à la concentration de 2 mM et le NADP à la concentration de 0,2 mM. Les figures 10A et 10B représentent les résultats des Tableaux IV et V dans le système de coordonnées de Lineweaver et Burk (33).

Glucose-6-Phosphate $\times 10^4$	V x Un./ml	$\frac{1}{V} \times 10^2$	$\frac{1}{G6P} \times 10^3$ mole^{-1}
2	12,4	8	5
3	13,6	7,3	3,3
5	16,8	5,9	2
10	19,2	5,2	1
50	20	5	0,2
100	20,8	4,8	0,1

Tableau IV : Activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase mesurée pour différentes concentrations de glucose-6-phosphate, en présence de NAD 2 mM.

Glucose-6-Phosphate $\times 10^4$	V x Un./ml	$\frac{1}{V} \times 10^2$	$\frac{1}{G6P} \times 10^3$ mole^{-1}
1	4,8	24	10
2	6,4	15,6	5
4	8	12,5	2,5
6	9,6	10,4	1,6
10	10,6	9,4	1
40	11,2	8,9	0,25
60	12	8,3	0,16
80	12,8	7,8	0,12

Tableau V : Activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase mesurée pour différentes concentrations de glucose-6-phosphate, en présence de NADP 0,2 mM.

2.3.2. Concentrations variables de NAD.

La figure 10C représente les résultats du Tableau VI dans le système de coordonnées de Lineweaver et Burk (33).

NAD $\times 10^4$	V x Un./ml	$\frac{1}{V} \times 10^2$	$\frac{1}{NAD} \times 10^3$ mole^{-1}
0,8	8,8	11,3	12,5
1,2	11,2	8,9	8,3
1,6	12	8,3	6,25
2	13,6	7,3	5
4	16,8	5,9	2,5
8	17,6	5,7	1,25
12	17,9	5,6	0,83
16	19,2	5,2	0,62

Tableau VI : Activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase mesurée pour différentes concentrations de NAD, en présence de glucose-6-phosphate 10 mM.

2.3.3. Concentrations variables de NADP.

La figure 10D représente les résultats du Tableau VII dans le système de coordonnées de Lineweaver et Burk (33).

NADP $\times 10^5$	V x Un./ml	$\frac{1}{V} \times 10^2$	$\frac{1}{NADP} \times 10^4$ mole^{-1}
0,8	5,6	17,9	12,5
1,2	6,8	14,7	8,3
1,6	8	12,5	6,2
2	9,2	10,9	5
4	11,2	8,9	2,5
8	12	8,3	1,25
12	13,6	7,3	0,8

Tableau VII : Activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase mesurée pour différentes concentrations de NADP, en présence de glucose-6-phosphate 10 mM.

2.3.4. Valeur des Km.

Les Km apparents estimés graphiquement pour les différents substrats sont les suivants :

Km glucose-6-phosphate (avec NAD) = 190 µM

Km NAD = 110 µM

Km glucose-6-phosphate (avec NADP) = 200 µM

Km NADP = 14 µM

2.4. Détermination de la masse moléculaire.

La masse moléculaire de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis a été estimée par filtration sur Sephadex G.200. La figure 11 représente le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume élué (fractions de 1,8 ml).

Dans ces conditions, la masse moléculaire a été estimée à 123.000 daltons.

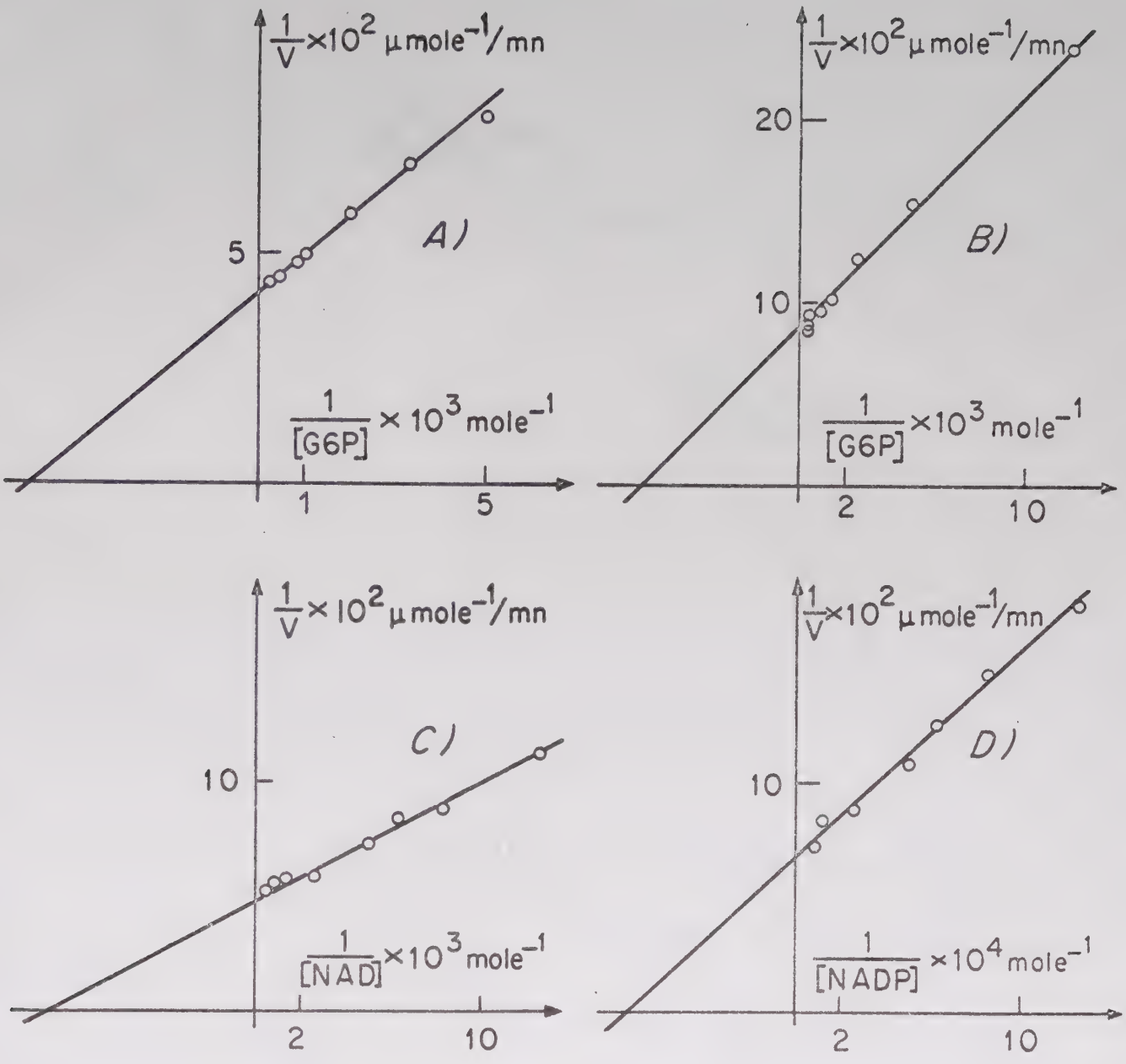


Figure 10 : Représentation, en coordonnées de Lineweaver et Burk, des vitesses initiales en fonction des concentrations en substrats.

A) - en fonction du G-6-P (réaction liée au NAD)

B) - en fonction du G-6-P (réaction liée au NADP)

C) - en fonction du NAD

D) - en fonction du NADP

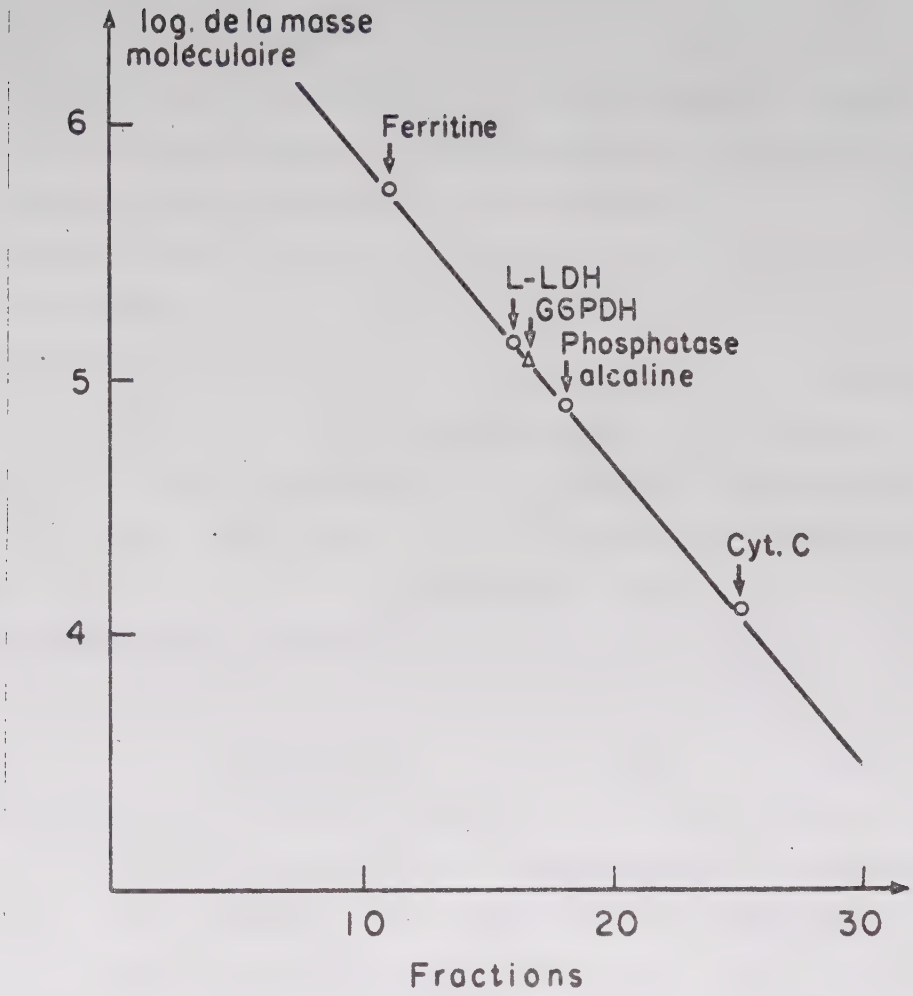


Figure 11 : Détermination de la masse moléculaire de la G-6-PDH, par filtration sur Sephadex G-200, en tampon tris-HCl 20 mM, pH 7,2 + NaCl 0,1 M : représentation du logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume élué.

III. DISCUSSION

Nous avons étudié quelques propriétés, d'une part de la D-lactate déshydrogénase, d'autre part de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546. Nous comparerons ces propriétés à celles des enzymes isofonctionnels chez d'autres microorganismes.

Toutes les bactéries lactiques possèdent une lactate déshydrogénase soit de type D- soit de type L-. Les D-lactate déshydrogénases se trouvent chez les Leuconostoc (19), chez un grand nombre de Lactobacillus (34), chez Pediococcus (35). Les propriétés des D-LDH de Leuconostoc lactis : NCDO 546 et NCDO 533, et de Leuconostoc mesenteroides ATCC 12291 (30, 36, 31) sont rassemblées dans le Tableau VIII. L'observation de ces résultats montre que ces enzymes ont de nombreuses propriétés communes. Cependant la migration électrophorétique en gèl de polyacrylamide des D-LDH des souches de Leuconostoc oenos ("souches acidophiles") se différencie nettement de celle des autres souches de Leuconostoc ("souches non acidophiles"), (Garvie 18, 19;et observation personnelle).

Les D-LDH des Lactobacillus étudiées par F. Gasser (34) et la D-LDH de Pediococcus cerevisiae étudiée par Doelle (35) sont semblables aux D-LDH des Leuconostoc : les masses moléculaires sont identiques (80.000 daltons par filtration sur gel ; 35.000 daltons par électrophorèse en SDS) ; les pH optima ont des valeurs très voisines, les cinétiques sont michaeliennes, les Km pour le D-lactate sont généralement très élevés (50 mM pour la D-LDH de Leuconostoc lactis NCDO 546 ; 70 mM pour celles de Lactobacillus leichmannii et Lactobacillus jenseni ; 30 mM pour celle de Pediococcus cerevisiae), leur thermosensibilité est grande (perte totale

Tableau VIII : Comparaison de quelques propriétés des D-lactate déshydrogénases de *Leuconostoc*.

	L.lactis NCDO 546	*L.lactis* NCDO 533 (36)	*L.mesenteroides* ATCC 12291 (31)
pH optimum :			
Pyruvate → Lactate	7,6	7,5	7,5
Lactate → Pyruvate	8	8	8,7
Km :			
D-lactate	50 mM	20 mM	-
NAD	12,5 mM	2,9 mM	2,2 mM
Pyruvate	2 mM	0,33 mM	1 mM
NADH	0,22 mM	0,15 mM	0,067 mM
Inactivation thermique à 50°C (10 mn)	100%	100%	100%
Inactivation par le pCMB	+	+	n.d.
Masse moléculaire :			
Séphadex G.200	80.000	77.000	n.d.
Vitesse sédimentation	n.d.	n.d.	64.100
Electrophorèse en présence de SDS	34.600	37.000	n.d.

n.d. : non déterminé.

de l'activité à 50°C, en moins de dix minutes pour la plupart de ces D-LDH). Il existe donc une grande homogénéité des propriétés structurales et fonctionnelles des D-LDH des bactéries lactiques ; celles-ci se différencient d'autres D-LDH connues au moins pour deux caractères importants au point de vue évolutif : la masse moléculaire et les cinétiques-michaeliennes ou allostériques.

Ainsi la D-LDH d'E. coli a une masse moléculaire de 133.000 daltons (37), celles de Pythium debaryanum (38) ou de Synechococcus (39) 115.000 daltons (Tableau IX). Quant aux cinétiques, les D-LDH des bactéries lactiques ne présentent aucun effet coopératif vis-à-vis de leurs substrats ou d'effecteurs tels que l'ATP, le GTP, le fructose-1,6-phosphate (observations personnelles). En cela, elles se distinguent des D-LDH d'E. coli (37) et de Butyribacterium rettgeri (40) qui présentent un effet coopératif du pyruvate, de la D-LDH de Pythium debaryanum (38) qui présente un effet coopératif du NADH et du lactate, et de celle d'Allomyces (41) qui présente un effet coopératif du NADH.

Pour une même fonction, une protéine enzymatique soumise à une régulation de type allostérique semble être apparue, au cours de l'évolution, plus récemment que celle présentant une cinétique michaelienne (42). En ce sens, les D-LDH des bactéries lactiques paraissent avoir une origine phylogénique plus primitive que les D-LDH d'E. coli, Butyribacterium rettgeri, Pythium debaryanum ou Allomyces. Il est, par ailleurs, intéressant de noter que dans l'arbre phylogénique du règne animal, on ne trouve plus de D-LDH après l'embranchement des Arachnides. Les L-LDH représentent certainement une étape plus récente de l'évolution puisqu'elles sont trouvées jusqu'au niveau des mammifères et qu'elles présentent un système très élaboré d'isozymes (43).

Tableau IX : Comparaison des masses moléculaires et des effecteurs allostériques des D-lactate déshydrogénases de quelques microorganismes.

Microorganismes	Masse moléculaire	Effecteur allostérique
Lactobacillus (34,54)	80.000	-
Leuconostoc (30,31,36)	80.000	-
Pediococcus (35)	71.000	-
Allomyces (41)	n.d.	NADH
Butyribacterium rettgeri (40)	n.d.	Pyruvate
E. coli (37)	133.000	Pyruvate
Pythium debaryanum (38)	115.000	D-lactate et NADH
Synechococcus (39)	115.000	-

n.d. : non déterminé

\- : résultat négatif

La glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546 est semblable à celle de Leuconostoc mesenteroides ATCC 12291 (= NCDO 768) étudiée par Lévy et Olive (29,44, 45). Toutes deux présentent des cinétiques michaeliennes vis-à-vis du glucose-6-phosphate et utilisent comme coenzyme le NAD ou le NADP ; leur masse moléculaire déterminée par filtration sur Sephadex G.200 est identique (Tableau X). Peu de résultats sont connus pour les glucose-6-phosphate déshydrogénases des Lactobacillus. Des travaux non publiés de F. Gasser (révélation spécifique d'activités après électrophorèse en gel de polyacrylamide) montrent que les enzymes isofonctionnels chez les Lactobacillus hétérofermentaires utilisent comme coenzymes le NAD et le NADP.

D'autres glucose-6-phosphate déshydrogénases bactériennes fonctionnent avec le NAD et le NADP : celles de Thiobacillus ferroxidans (46), Pseudomonas facilis (47), Pseudomonas fluorescens (47), Pseudomonas aeruginosa (48), Nocardia opaca (49), Hydrogenomonas eutropha (50), Rhodopseudomonas spheroides (51), Arthrobacter (52), Azotobacter beijerinckii (53). Les enzymes de Thiobacillus ferroxidans, Pseudomonas facilis et Nocardia opaca présentent, comme les glucose-6-phosphate déshydrogénases des Leuconostoc, des cinétiques michaeliennes vis-à-vis du glucose-6-phosphate. D'autres enzymes comme ceux de Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Hydrogenomonas eutropha, Azotobacter beijerinckii, Rhodopseudomonas et Arthrobacter présentent des courbes de saturation sigmoïdales vis-à-vis du glucose-6-phosphate et sont inhibés, de manière allostérique, soit par l'ATP, soit par le phospho-énol-pyruvate.

Tableau X : Comparaison des propriétés des glucose-6-phosphate déshydrogénases de *Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc mesenteroides*.

	L. lactis (30)	*L. mesenteroides* (29)
pH optimum :		
Réaction liée au NAD	7,8	7,8
Réaction liée au NADP	10	9
Km apparents :		
G-6-P (NAD)	190 µM	64 µM
NAD	110 µM	110 µM
G-6-P (NADP)	200 µM	36 µM
NADP	14 µM	7,4 µM
$\frac{\text{Vitesse NAD}}{\text{Vitesse NADP}}$ (au pH optimal)	1,83	1,83
Masse moléculaire (Séphadex G.200)	123.000	126.000

C H A P I T R E I I I

ETUDE IMMUNOLOGIQUE COMPARATIVE ENTRE ENZYMES ISOFONCTIONNELS CHEZ LES LEUCONOSTOC

Avec les trois enzymes purs : D-lactate déshydrogénase et glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546, et glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768, nous avons préparé trois immuns-sérums spécifiques. Une étude immunologique qualitative, par diffusion en milieu gélifié, a été faite pour mettre en évidence les relations structurales de ces trois enzymes avec leurs enzymes isofonctionnels chez 50 souches de Leuconostoc. Cette étude a été étendue dans certains cas à des souches de Lactobacillus. Les résultats exposés séparément pour chaque enzyme permettent de différencier des groupes de spécificité immunologique dont la signification sera discutée.

I. MATERIEL ET METHODES

1. - Préparation et contrôle des immuns-sérums.

1.1. Fractions immunogènes.

La fraction CD I (Voir Chapitre I) a été utilisée comme immunogène pour la préparation du sérum anti-D-LDH de Leuconostoc lactis.

Les fractions issues de deux électrophorèses préparatives de la fraction GD I (Voir Chapitre I) ont été utilisées pour la préparation du sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc lactis.

Les fractions issues des électrophorèses préparatives de l'enzyme commercial ont été utilisées pour la préparation du sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc mesenteroides.

1.2. Immunisation des lapins.

L'immunisation a été pratiquée sur des lapins agés de 3 mois, de race néo-zélandaise blanche. Avant toute immunisation, le sérum des lapins a été contrôlé par précipitation en milieu gélifié, pour son absence de réactivité croisée vis-à-vis de l'immunogène qui lui sera ultérieurement injecté.

Le protocole d'immunisation est le suivant :

. 4 injections intra-dermiques, à 1 semaine d'intervalle, du mélange : 80 µg d'enzyme dans 0,25 ml de NaCl 0,15 M + 5 µl d'une solution à 1 % de sérum albumine bovine méthylée (55) + 0,25 ml d'adjuvant de Freund (DIFCO).

. 1 ou 2 injections de rappel, 10 jours après la dernière injection immunisante :

- soit par voie intra-veineuse avec 250 µg d'enzyme dans 1 ml de NaCl 0,15 M + 15 µl de sérum albumine bovine méthylée à 1 %,

- soit par voie intra-dermique dans les mêmes conditions que pour l'immunisation.

Le sang total de chaque lapin est recueilli par ponction carotidienne. Après décantation pendant une nuit à 20°C, le sérum est recueilli par centrifugation 20 mn à 2.500 t/mn.

Il est filtré sur membrane Millipore et conservé à + 4°C après addition de 0,04 % d'azoture de sodium.

1.3. Immunoélectrophorèse.

La spécificité des immuns-sérums a été contrôlée par immunoélectrophorèse selon la méthode de Grabar et Williams (56). Le support est du gel d'agarose à 1 % dans du tampon véronal pH 8,2. L'intensité appliquée est de 8 volts/cm ; la durée de l'électrophorèse est de 2 heures ; l'immunodiffusion se poursuit 24 heures ou 36 heures à + 4°C. Sur une même plaque, deux fractions du même extrait brut sont soumises à la migration électrophorétique. Une fraction située près de la rainure contenant l'immun-sérum donnera naissance à l'immun-précipité tandis que la deuxième fraction permettra de localiser l'activité enzymatique dont la migration doit coïncider avec la ligne de l'immun-précipité (coloration décrite pour les gels de polyacrylamide au Chapitre I).

2. - Préparation des extraits bruts.

2.1. Souches bactériennes.

2.1.1. La liste des souches de Leuconostoc étudiées -classées suivant les groupes taxonomiques d'E. Garvie (18)- est la suivante :

2.1.1.1. Leuconostoc cremoris

(Groupe I) : NCDO 543, NCDO 829.

2.1.1.2. Leuconostoc lactis

(Groupe II) : NCDO 532, NCDO 533, NCDO 534, NCDO 535, NCDO 536, NCDO 546, NCDO 549, NCDO 956, NCDO 959.

2.1.1.3. Leuconostoc paramesenteroides

(Groupe III) : NCDO 803, NCDO 870, NCDO 871, NCDO 872, NCDO 873, NCDO 885, NCDO 886, NCDO 955.

2.1.1.4. Leuconostoc dextranicum

(Groupe IV) : NCDO 517, NCDO 529, NCIB* 3739.

(Groupe V) : NCDO 812, NCIB 2706, NCIB 3356.

2.1.1.5. Leuconostoc mesenteroides

(Groupe VI) : CIP* 54168, CIP 54169, CIP 54170, CIP 54171, NCIB 8013, NCDO 522, NCDO 523, ATCC 10830, NCDO 1533, NCDO 768, NCIB 9317, NCDO 882, NCIB 9319, NCIB 3351, V 16, Le 512-17, Le 513-7, Le 513-12, Le 512-13.

2.1.1.6. Leuconostoc oenos

(Groupe VII) : ATCC 23278, WL D1, WL BG 31, WL B6, WL LA1, SC 122 (ces cinq dernières souches proviennent du Laboratoire du Dr. Rogosa).

2.1.2. Quelques souches de Lactobacillus ont été testées :

2.1.2.1. Lactobacillus brevis

NCDO 391, ATCC 14869.

2.1.2.2. Lactobacillus buchneri

NCDO 110.

2.1.2.3. Lactobacillus fermenti

CNRZ 236**.

2.1.2.4. Autres Lactobacillus hétérofermentaires : ATCC 23272, 61 AC, 65 A, 61 AZ, V 19-3, F 15 et 61 H. Ces souches ont été différenciées en groupes HL I, HL II, HL III, au cours de travaux immunologiques antérieurs (12).

2.1.2.5. Lactobacillus viridescens

NCDO 403, NCDO S40.

* NCIB : National Collection of Industrial Bacteria ; CIP : Collection de l'Institut Pasteur.

** CNRZ : Centre National de Recherche Zootechnique.

2.2. Conditions de culture.

Les bactéries, à l'exception des souches du groupe VII, sont cultivées dans le milieu MRS (57) contenant 15 g/l de glucose. Les cultures sont effectuées à 30°C, en aérobiose, en agitant 500 ml de milieu dans des fioles de Fernbach de 2l. Les cellules sont récoltées en fin de phase exponentielle par centrifugation à 15.000 g pendant 25 mn à + 4°C.

Les souches du groupe VII sont cultivées dans le milieu MRS acidifié à pH 5 avec de l'acide lactique. Pour certaines souches, ce milieu est additionné de 10 g/l de ribose stérile. Les cultures sont effectuées à 30°C, sans agitation, dans des fioles de 750 ml contenant 500 ml de milieu.

Les cellules bactériennes, lavées deux fois ave du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,sont conservées, après centrifugation, à - 30°C.

2.3. Préparation des extraits bruts.

Les extraits bruts sont préparés par sonication (10 à 30 mn suivant les souches) des cellules mises en suspension (100 mg/ml en poids humide) dans du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 + dithiothréitol 1 mM + EDTA 1 mM. L'extrait brut est débarrassé des débris cellulaires par centrifugation à 31.000 g pendant 20 mn.

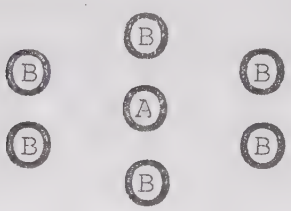
3. - Immunodiffusion.

3.1. Technique.

Les expériences d'immunodiffusion ont été faites selon la méthode d'Ouchterlony (58). Une solution aqueuse d'Ionagar (Oxoïd n° 2) à 1,7 % est mélangée, à chaud, à un

égal volume de tampon barbital (acide barbiturique : 1,84 g ; acétate de sodium : 6,8 g ; barbital : 10, 31 g ; merthiolate : 0,2 g ; eau déminéralisée q.s.p. 1.000 ml). 22 ml de cette solution sont répandus sur des plaques de verre de 8,5 cm x 10 cm. Après refroidissement et durcissement des gels ceux-ci sont conservés à + 4°C dans des chambres humides.

Au moment de l'utilisation, six puits de différents diamètres (suivant la quantité d'extrait brut nécessaire) sont pratiqués dans le gel, situés à égale distance d'un puits central (celui-ci recevant l'immun-sérum).



A = immun-sérum,
B = extraits bruts bactériens,
A ⟷ B = 0,8 cm.

Le puits central recevra :

- soit: 30 µl de sérum anti-D-LDH de Leuconostoc lactis.
- soit: 60 µl de sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc lactis.
- soit: 20 µl de sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc mesenteroides.

Dans les puits latéraux, on mettra une quantité d'extrait brut correspondant à :

- 0,5 unité d'activité dans les tests avec les sérums anti-D-LDH et anti-G-6-P-DH de Leuconostoc lactis.
- 2 unités d'activité dans les tests avec le sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc mesenteroides.

Les gels sont placés en chambre humide à + 4°C et examinés après 24, 48 et 72 heures. Deux clichés photo-

graphiques sont pris, l'un à 24 heures, l'autre à 48 heures.

Tous les extraits bruts des souches citées sont "croisés" deux à deux dans ce système c'est-à-dire placés dans deux puits adjacents de façon à examiner l'image de la ligne commune de précipité.

3.2. Interprétation des résultats.

L'interprétation des images de précipitation est faite selon les indications données par F. Gasser et col. (12) que nous rappelerons ici.

L'antigène H est constitué par la protéine enzymatique portant un certain nombre de déterminants antigéniques différents (59). L'immun-sérum homologue est formé de l'ensemble des anticorps de spécificité différente, dirigés contre les déterminants antigéniques de H ; à une molécule d'antigène correspond une population hétérogène d'anticorps spécifiques des différents déterminants antigéniques.

3.2.1. Comparaison H - h.

Lorsque l'antigène H est comparé à un autre antigène h montrant une réactivité croisée dans une expérience de double diffusion, deux images peuvent être obtenues :

3.2.1.1. Fusion complète des lignes de précipité. Tous les déterminants de H sont portés par h ; h est immunologiquement semblable à H. On dit qu'il est HOMOLOGUE. Toutefois, cela ne veut pas dire que h est identique à H car h peut porter des déterminants antigéniques non présents sur H, donc non reconnus par l'immun-sérum anti-H.

L'ensemble des souches semblables immunologiquement constitue le groupe HOMOLOGUE.

3.2.1.2. Fusion partielle des lignes de précipité avec formation d'éperon dirigé vers le puits contenant h. Dans ce cas h est HETEROLOGUE.H possède des déterminants antigéniques communs avec h et un ou plusieurs déterminants antigéniques non présents sur h.

3.2.2. Comparaison h_1 - h_2.

Lorsque deux antigènes hétérologues h_1 et h_2 sont comparés deux à deux, trois images peuvent être obtenues :

3.2.2.1. Fusion complète des lignes de précipité sans formation d'éperon; h_1 et h_2 peuvent porter des déterminants en commun avec H ; cependant h_1 et h_2 peuvent porter des déterminants antigéniques qui ne se trouvent pas sur H.

Les souches hétérologues qui ne forment pas entre elles d'éperon mais une ligne de précipité continue constituent un groupe de spécificité identique apparente.

3.2.2.2. Fusion partielle des lignes de précipité avec formation d'un éperon, dirigé soit vers h_1, soit vers h_2 . Prenons l'exemple d'un éperon dirigé vers h_2. Ceci veut dire que h_1 et h_2 portent un ou plusieurs déterminants antigéniques en commun avec H mais que h_1 possède au moins un déterminant antigénique commun avec H de plus que h_2.

Par comparaison deux à deux des souches hétérologues, on peut établir un ordre de similarité antigénique décroissant :

$$H > h_1 > h_2 > \ldots\ldots h_n$$

Cet ordre reflète la possession par des molécules antigéniques hétérologues, d'un nombre décroissant de déterminants antigéniques communs avec H.

3.2.2.3. Fusion partielle des lignes de précipité avec formation de deux éperons, chacun dirigé vers l'un des puits adjacents contenant l'extrait brut. Dans ce cas, h_1 et h_2, et H possèdent en commun un certain nombre de déterminants antigéniques ; de plus, h_1 possède des déterminants en commun avec H que h_2 ne possède pas et réciproquement pour h_2 .

Les images des plaques d'Ouchterlony et leurs symboles sont donnés par la Figure 12.

3.3. Organisation des résultats.

Les réactivités croisées permettent de définir :

3.3.1. Le groupe homologue (ligne de précipité continue avec la souche homologue).

3.3.2. Les groupes hétérologues, classés en groupes de spécificité identique apparente.

3.3.3. L'ordre de similarité décroissante d'après la position des éperons.

II. RESULTATS

1. Spécificité des immuns-sérums.

La spécificité de chaque sérum a été contrôlée par immunoélectrophorèse.

Avec le sérum obtenu après injection de la fraction CD I de la D-lactate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546, nous obtenons une seule ligne de précipité correspondant à la localisation de l'activité D-LDH.

Avec le sérum obtenu après injection de la fraction issue de l'électrophorèse préparative de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546, nous obtenons une seule ligne de précipité correspondant à la localisation de l'activité glucose-6-phosphate.

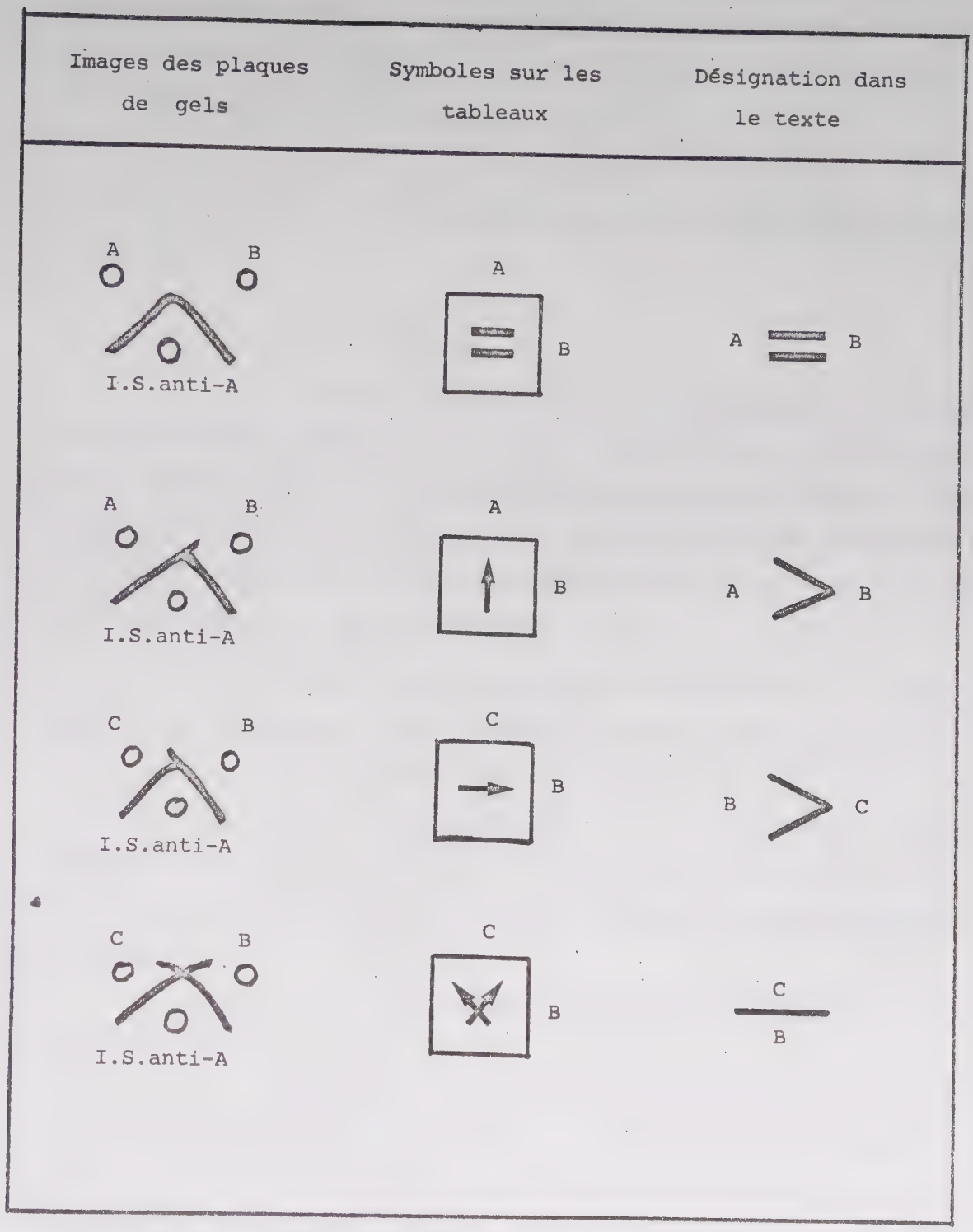


Figure 12 : Images des plaques d'Ouchterlony et symboles correspondants utilisés dans le texte.

Avec le sérum obtenu après injection de la fraction issue de l'électrophorèse préparative de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768, nous obtenons une seule ligne de précipité correspondant à la localisation de l'activité G-6-PDH.

2. Etude à partir du sérum anti-D-LDH de Leuconostoc lactis NCDO 546.

2.1. LEUCONOSTOC.

Toutes les souches de Leuconostoc étudiées ont donné des réactions croisées avec le sérum anti-D-lactate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546,à l'exception de deux d'entre elles : NCDO 955 et CIP 54169.Aucune activité D-LDH n'a pu être décelée dans les extraits bruts obtenus à partir de ces souches.

Parmi les Leuconostoc,le sérum anti-D-LDH a permis de déterminer les groupes suivants (Tableau XI) :

2.1.1. Groupe homologue : A

Ce groupe renferme toutes les souches présentant une identité totale avec la souche homologue NCDO 546.Elles appartiennent toutes au groupe des Leuconostoc lactis.

2.1.2. Groupes de spécificité identique apparente : B, C, D, E, F, G.

Toutes les souches de ces six groupes sont des souches hétérologues vis-à-vis de celles du groupe A. En étudiant deux à deux toutes les combinaisons de souches possibles,nous avons déterminé six groupes de spécificité identique apparente.Toutes les souches d'un même groupe présentent,entre elles,une réaction d'identité totale (fusion complète des lignes de précipité sans formation d'éperon)et

des réactions d'identité partielle (avec formation d'éperon) avec les souches des autres groupes de spécificité identique apparente.Les six groupes sont détaillés dans le Tableau XI.

- Les groupes B et C contiennent seulement trois souches de Leuconostoc mesenteroides.

- Le groupe D est un important groupe de souches regroupant toutes les souches de Leuconostoc cremoris, toutes les souches de Leuconostoc dextranicum et un grand nombre de souches de Leuconostoc mesenteroides.

- Le groupe E contient seulement deux souches de Leuconostoc mesenteroides.

- Le groupe F contient uniquement des souches de Leuconostoc paramesenteroides.

- Le groupe G est constitué exclusivement de souches de Leuconostoc oenos.Dans ce cas,les réactions croisées obtenues sont très faibles.

Dans le Tableau XII,nous avons représenté les relations immunologiques existant entre les différents groupes définis au sein des Leuconostoc. De ce Tableau,nous avons déduit l'ordre de similarité immunologique décroissante par rapport au sérum anti-D-LDH de Leuconostoc lactis NCDO 546 :

$$A > B > C \begin{matrix} > D \\ \longrightarrow \\ > F \end{matrix} E > G$$

2.2. LACTOBACILLUS.

Une réaction croisée a été mise en évidence avec les Lactobacillus hétérofermentaires,avec Lactobacillus buchneri et avec Lactobacillus viridescens. Ces réactions faibles ont,cependant,permis d'établir un ordre de similarité décroissante :

Souches	Groupes immunologiques
NCDO 532,533,534,535,536,546,549 956,959.	A
CIP 54171,NCIB 3351.	B
NCIB 9317.	C
NCDO 543,829, NCDO 517,529,NCIB 3739, NCIB 2706,3356,NCDO 812, NCIB 8013,8710,9319, NCDO 522,523,1533,ATCC 10830, V 16,CIP 54168,CIP 54170, Le 512-13,Le 512-17,Le 513-7, Le 513-12.	D
NCDO 768,882.	E
NCDO 803,870,871,873,885,886,	F
WL D1,WL BG31,WL B6,WL LA1,SC 122.	G

Tableau XI : Groupes de spécificité déterminés par le sérum anti-D-lactate déshydrogénase de *Leuconostoc lactis*.

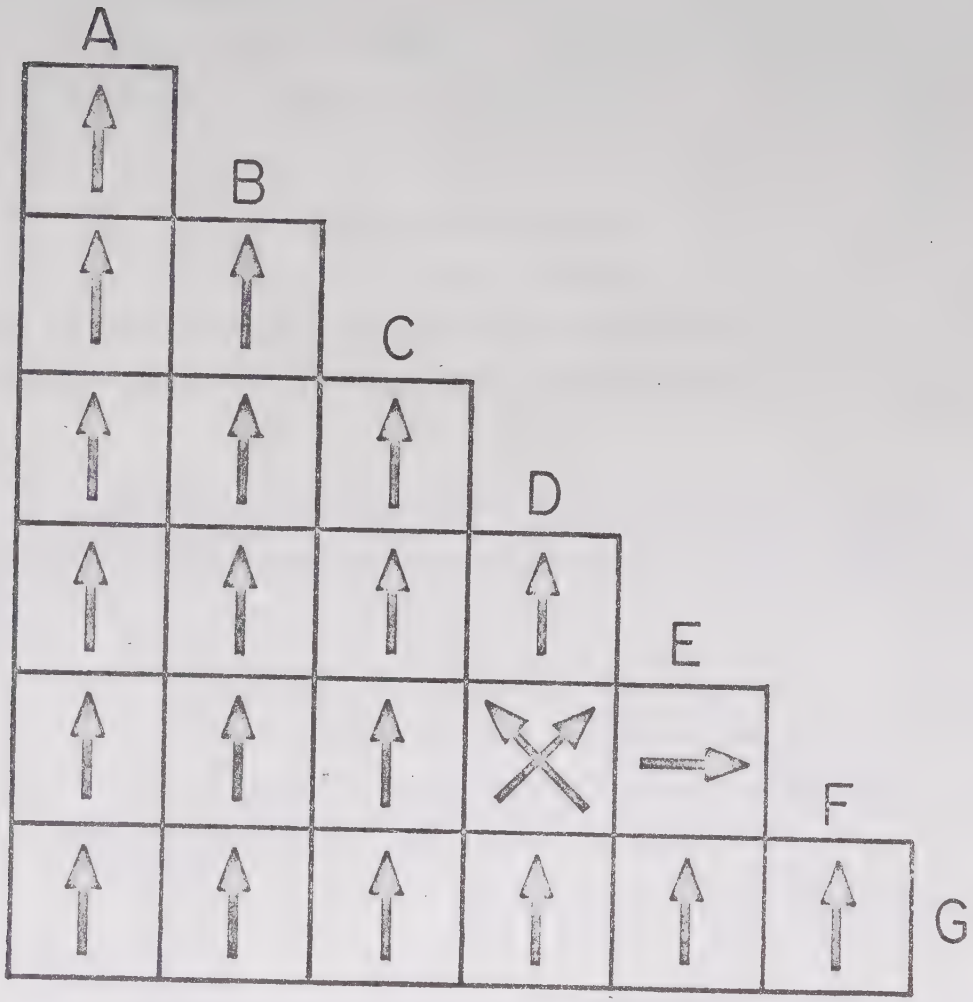


Tableau XII : Relations entre les différents groupes déterminés par le sérum anti-D-LDH de *Leuconostoc lactis* NCDO 546 (suivant les symboles de la figure 12).

Leuconostoc > L.viridescens > L.buchneri > Lactobacillus hétérofermentaires.

3. Etude à partir du sérum anti-glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546.

3.1. LEUCONOSTOC.

Comme pour le sérum anti-D-LDH, les extraits bruts des différentes souches de Leuconostoc ont été étudiés pour leur capacité à donner des réactions croisées avec l'immun-sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc lactis. Tous les extraits bruts ont donné lieu à une réaction croisée à l'exception des souches de Leuconostoc oenos chez lesquelles une activité G-6-PDH mesurée dans les conditions du Chapitre I n'a pu être décelée.

Le sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc lactis a permis de déterminer les groupes suivants, exposés dans le Tableau XIII :

3.1.1. Groupe homologue : a

Ce groupe renferme les mêmes souches que le groupe A défini par le sérum anti-D-LDH c'est-à-dire les souches de Leuconostoc lactis et elles seules.

3.1.2. Groupes de spécificité identique apparente : b, c, d, e, f.

Cinq groupes de spécificité identique apparente ont été déterminés :

- Les groupes b et c renferment les mêmes souches que les groupes B et C, obtenus avec le sérum anti-D-LDH.
- Le groupe d rassemble les mêmes souches que le groupe D plus la souche NCDO 768.
- Le groupe e est constitué par la seule souche NCDO 882.
- Le groupe f rassemble les mêmes souches que

Souches	Groupes immunologiques
NCDO 532,533,534,535,536,546,549, 956,959.	a
CIP 54171,NCIB 3351.	b
NCIB 9317.	c
NCDO 543,829, NCDO 517,529,NCIB 3739, NCDO 2706,3356,NCDO 812, NCIB 8013,8710,9319, NCDO 522,523,1533,ATCC 10830, V 16,CIP 54168,CIP 54170, Le 512-13,Le 512-17,Le 513-7, Le 513-12,NCDO 768.	d
NCDO 882.	e
NCDO 803,870,871,872,873,885,886, NCDO 955,CIP 54169.	f

Tableau XIII : Groupes de spécificité déterminés par le sérum anti-glucose-6-phosphate déshydrogénase de *Leuconostoc lactis*.

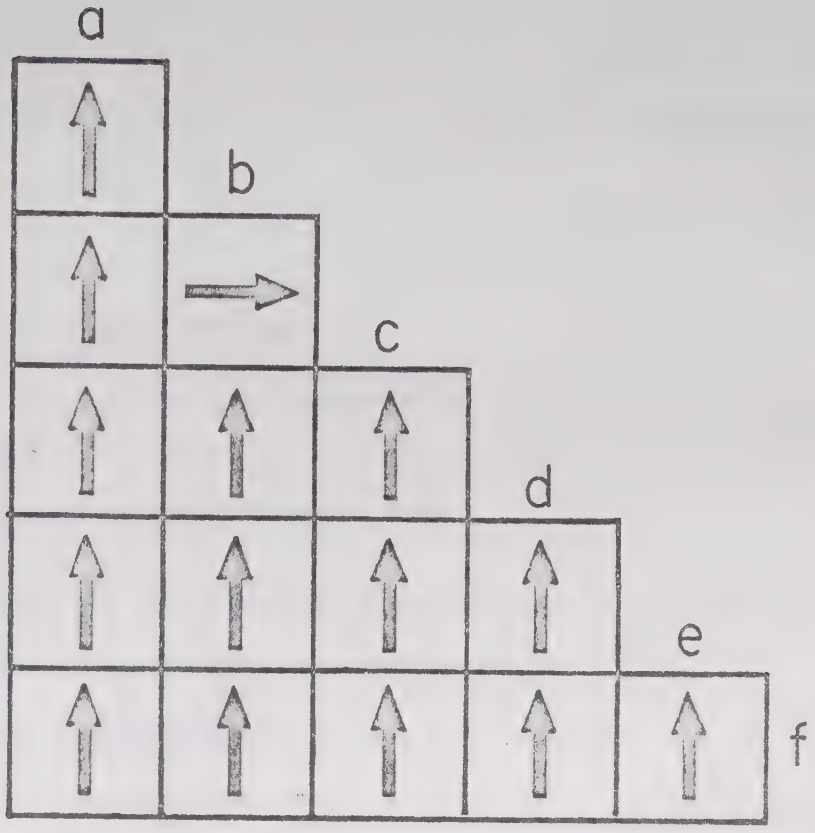


Tableau XIV : Relations entre les différents groupes déterminés par le sérum anti-G-6-P-DH de *Leuconostoc lactis* NCDO 546 (suivant les symboles de la figure 12).

le groupe F plus les deux souches NCDO 955 et CIP 54169 qui n'avaient pas donné de réaction croisée avec le sérum anti-D-LDH.

Le Tableau XIV donne les relations des différents groupes de spécificité identique apparente entre eux. De ce Tableau, nous pouvons déduire un ordre de similarité décroissante par rapport au sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc lactis NCDO 546 :

$$a > c > b > d > e > f$$

3.2. LACTOBACILLUS.

Seules les souches de Lactobacillus viridescens ont donné une réaction croisée avec le sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc lactis NCDO 546.

4. Etude à partir du sérum anti-glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768.

4.1. LEUCONOSTOC.

Tous les extraits bruts des souches de Leuconostoc ont donné des réactions croisées avec ce sérum à l'exception des souches de Leuconostoc oenos comme dans le cas du sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc lactis NCDO 546.

Le sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc mesenteroides a permis de déterminer les groupes suivants exposés au Tableau XV (pour faciliter la comparaison des groupes obtenus avec les sérums précédents nous avons gardé les mêmes lettres affectées d'un indice prime pour désigner les groupes obtenus avec le sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc mesenteroides) :

4.1.1. Groupe homologue : e'

Ce groupe renferme les souches NCDO 768 et NCDO 882.

4.1.2. Groupes de spécificité identique apparente : a', b', d', f'. Quatre groupes de spécificité identique apparente ont été déterminés.

- Le groupe a' rassemble toutes les souches de Leuconostoc lactis et elles seules.

- Le groupe b' rassemble deux souches de Leuconostoc mesenteroides déjà rassemblées dans les groupes B et b. Cependant ces deux souches donnent des réactions d'identité totale avec certaines souches des groupes D et d.

- Le groupe d' rassemble toutes les souches des groupes D et d plus la souche NCIB 9317 qui appartenait aux groupes C et c.

- Le groupe f' rassemble toutes les souches du groupe f et elles seules.

Le Tableau XVI donne les relations des différents groupes de spécificité identique apparente entre eux. L'ordre de similarité décroissante par rapport au sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768 est le suivant :

$$e' > d' = c' \geq b' > a' > f'$$

4.2. LACTOBACILLUS.

Seules les souches de Lactobacillus viridescens ont donné une réaction croisée avec le sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768.

Souches	Groupes immunologiques
NCDO 532,533,534,535,536,546,549, 956,959.	a'
CIP 54171,NCIB 3351.	b'
NCIB 9317, NCDO 543,829, NCDO 517,529,NCIB 3739, NCIB 2706,3356,NCDO 812, NCIB 8013,8710,9319, NCDO 522,523,1533,ATCC 10830, V 16, CIP 54168,CIP 54170, Le 512-13,Le 512-17,Le 513-7, Le 513-12.	d'
NCDO 768,882.	e'
NCDO 803,870,871,872,873,885,886, NCDO 955,CIP 54169.	f'

Tableau XV : Groupes de spécificité déterminés par le sérum anti-glucose-6-phosphate déshydrogénase de *Leuconostoc mesenteroides*.

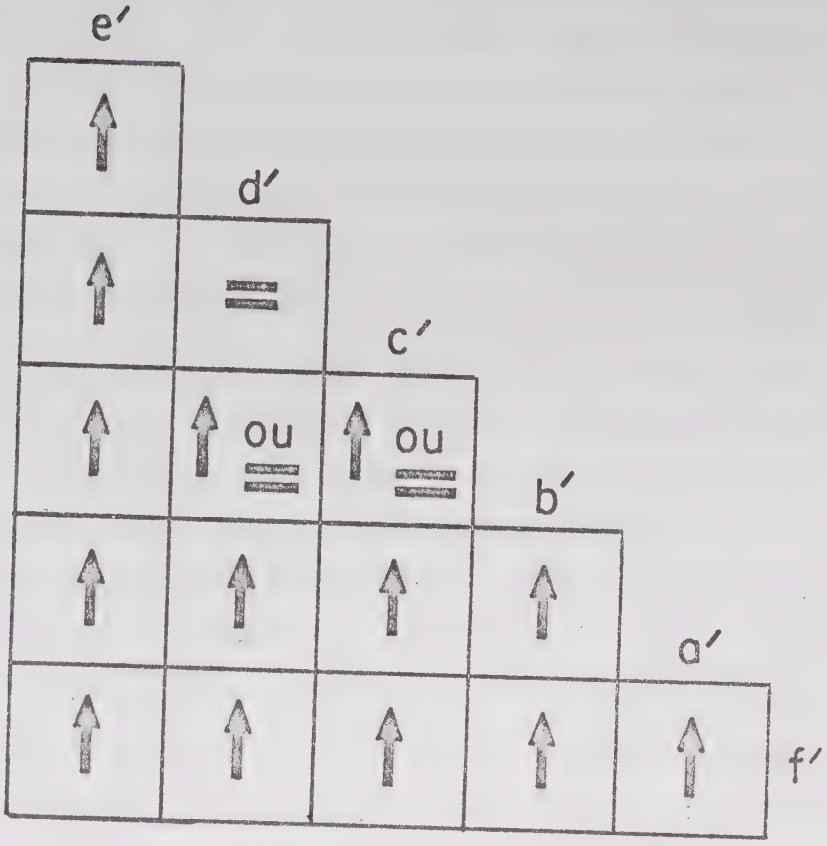


Tableau XVI : Relations entre les différents groupes déterminés par le sérum anti-G-6-P-DH de *Leuconostoc mesenteroides* NCDO 768 (suivant les symboles de la figure 12).

III. DISCUSSION

Au début de ce travail, nous avions posé la question de savoir si l'étude des parentés de structure d'une seule protéine isofonctionnelle de différentes souches bactériennes permettrait de retracer les liens phylogéniques actuels de ces bactéries ou si, au contraire, elle refléterait uniquement les modifications de structure d'un seul gène. Pour y répondre nous avons déterminé parallèlement les groupes de spécificité immunologique de deux protéines enzymatiques différentes · la D-lactate déshydrogénase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase provenant d'une même souche bactérienne : Leuconostoc lactis NCDO 546. L'examen des Tableaux XI et XIII donne la réponse à cette question ; les groupements de souches déterminés avec le sérum anti-D-LDH de Leuconostoc lactis NCDO 546 et ceux déterminés avec le sérum anti-G-6-P-DH de la même souche sont identiques. Donc les groupes de spécificité identique apparente A, B, C, D, E, F, G, tels qu'ils sont présentés dans le Tableau XI semblent correspondre aux groupes taxonomiques naturels reflétant l'état actuel de la phylogénie des Leuconostoc, d'autant plus que les groupes peu représentés comme les groupes Bb, Cc, Ee, rassemblent les mêmes souches quelle que soit la spécificité de l'immun-sérum. En ce sens, l'étude d'une seule protéine isofonctionnelle pourrait être à l'origine de la détermination des unités taxonomiques naturelles.

Cette étude achevée, il est rapidement apparu intéressant de la compléter par celle de l'une ou l'autre des protéines isofonctionnelles (D-LDH ou G-6-P-DH) provenant d'une souche hétérologue. La possibilité d'obtenir rapidement un immun-sérum à partir d'un enzyme commercial partiellement purifié nous a conduit à préparer l'immun-sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768. Les groupes de spécifi-

cité identique apparente résultant de cette étude sont très semblables à ceux obtenus avec les sérums anti-D-LDH et anti-G-6-P-DH de Leuconostoc lactis à l'exception du groupe c' représenté par une seule souche et qui se confond avec le groupe d'.

Donc si nous analysons les résultats de ces études immunologiques (Tableau XVII) envisagées dans le but d'établir une taxonomie naturelle des Leuconostoc, nous remarquons :

- Les groupes A, a, a' sont tous les trois constitués des mêmes souches qui appartiennent toutes au groupe des Leuconostoc lactis (nomenclature E. Garvie (18)),

- Les groupes F, f, f' sont tous les trois constitués des mêmes souches qui appartiennent toutes au groupe des Leuconostoc paramesenteroides (nomenclature E. Garvie (18)),

- Le groupe G rassemble toutes les souches de Leuconostoc oenos (nomenclature E. Garvie (18)) et elles seules,

- Les groupes D, d, d', sont constitués des souches de Leuconostoc cremoris (nomenclature E. Garvie (18)), Leuconostoc dextranicum (nomenclature E. Garvie (18)), et de souches de Leuconostoc mesenteroides (nomenclature E. Garvie (18)). Il est remarquable de voir que toutes les souches étudiées de Leuconostoc cremoris et de Leuconostoc dextranicum sont groupées et rassemblées avec la majorité des souches de Leuconostoc mesenteroides. Cela est d'autant plus remarquable que les souches de Leuconostoc cremoris sont totalement différentes du point de vue des caractères fermentaires (Voir Tableau Ia).

Souches	Groupes immunologiques de la D-LDH de *L. lactis*	Groupes immunologiques de la G6PDH de *L. lactis*	Groupes immunologiques de la G6PDH de *L. mesenteroides*	Groupes de Garvie
NCDO 532,533,534,535,536, 546,549,956,959.	A	a	a'	II
CIP 54171,NCIB 3351	B	b	b'	VI
NCIB 9317	C	c	d'	VI
NCDO 543,829,	D	d	d'	I
NCDO 517,529,NCIB 3739	"	"	"	IV
NCIB 2706,3356,NCDO 812,	"	"	"	V
NCIB 8013,8710,9319,	"	"	"	VI
NCDO 522,523,1533,ATCC 10830,	"	"	"	"
V 16,CIP 54168,CIP 54170	"	"	"	"
Le 512-13,Le 512-17,Le 513-7,	"	"	"	"
Le 513-12	"	"	"	"
NCDO 768(1),882	E	e	e'	VI
NCDO 803,870,871,872,873,885, 886,955(2),CIP 54169(2).	F	f	f'	III
WL D1,WL BG31,WL B6,WL LA1, SC 122.	G	-	-	VII

Tableau XVII : Groupes de spécificité immunologique déterminés avec trois immuns-sérums anti-enzymes de *Leuconostoc*.

(1) La souche NCDO 768 appartient au groupe d et non au groupe e.
(2) Les souches NCDO 955 et CIP 54169 ne présentent pas de réactivité croisée avec le sérum anti-DLDH.

En ce qui concerne les souches des groupes B, b, b', C et c, il est encore difficile au regard de nos résultats de leur assigner une position taxonomique définitive. Il semblerait que la souche NCIB 9317 du groupe C soit en fait assimilable au groupe D si on se tient aux résultats obtenus avec le sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc mesenteroides (c' = d'). Quant aux deux souches du groupe B nous avons vu que les résultats obtenus avec le sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc mesenteroides étaient variables selon les souches, à l'intérieur du groupe D.

Pour essayer d'établir une carte phylogénique des Leuconostoc, examinons les ordres de similarité décroissante vis-à-vis des deux sérums anti-G-6-P-DH de Leuconostoc lactis et de Leuconostoc mesenteroides :

L. lactis $a > c > b > d > e > f$

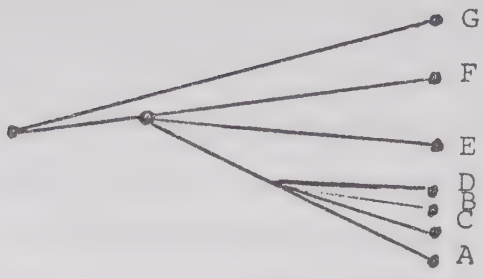
L. mesenteroides $e' > \underset{c'}{\overset{d'}{\geqslant}} > b' > a' > f'$

Nous voyons que le groupe f des Leuconostoc paramesenteroides se trouve, dans les deux cas, le plus éloigné comme si, pour ce groupe, la divergence évolutive était plus grande que pour les autres groupes par rapport aux points de référence choisis. Ce groupe serait le résultat d'une voie divergente comme le montre la position sur une voie branchée du groupe F vis-à-vis du sérum anti-D-LDH de Leuconostoc lactis :

$$A > B > C \begin{array}{l} > D \\ \longrightarrow > E > G \\ > F \end{array}$$

Par contre, l'ordre de similarité décroissante pour les autres groupes : $a > c > b > d > e$ -lorsque la référence est la

souche NCDO 546 (groupe a)- est lu en sens inverse lorsque la référence est la souche NCDO 768 : e'>d'>b'>a'. Un schéma évolutif des différents groupes de Leuconostoc pourrait être envisagé de la manière suivante :



C H A P I T R E I V

ETUDE DES TAUX D'HYBRIDATION DES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES DE CINQUANTE SOUCHES DE LEUCONOSTOC

L'origine phylogénique commune des souches de Leuconostoc étudiées est démontrée, dans le chapitre précédent, par les homologies de structure de deux enzymes isofonctionnels (D-LDH et G-6-PDH). Cependant des différences ont permis de mettre en évidence plusieurs groupes de spécificité antigénique. En analysant la totalité du génome par hybridation ADN-ADN, nous pourrons déterminer des groupes d'hybridation qui seront comparés aux groupes de spécificité antigénique.

La première étape de ce travail a consisté à établir des conditions standard de lyse des bactéries permettant une bonne extraction de l'ADN. Les bactéries lactiques, $Gram^+$, sont connues pour être difficiles à lyser (60) et également peu sensibles à l'action du lysozyme utilisé jusqu'à la concentration de 500 mg/ml par certains auteurs (61). La purification des ADN a été obtenue par traitement sur hydroxylapatite en présence de fortes concentrations d'urée (62), conditions qui nous ont donné des rendements bien supérieurs à ceux que nous avait donnés la précipitation alcoolique. La dénaturation thermique a permis de déterminer la température de fusion des ADN à partir de laquelle nous avons pu calculer le contenu en G + C. Pour les hybridations, nous avons choisi la méthode à l'hydroxylapatite (63, 64) pour ses avantages : efficacité comparée aux techniques sur filtres de nitro-cellu-

lose, possibilité éventuelle de pratiquer des élutions thermiques (64).

Les souches de référence sont :

- la souche de Leuconostoc lactis NCDO 546,
- la souche de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768,
- la souche de Leuconostoc mesenteroides NCDO 523,
- la souche de Leuconostoc paramesenteroides NCDO 803,

Les ADN ont été marqués à la thymidine tritiée.

I. MATERIEL

1. - Souches.

Les souches bactériennes ont été énumérées au Chapitre III.

2. - Cultures.

2.1. Les bactéries sont cultivées dans les conditions du Chapitre III.

2.2. Cultures radioactives.

Les souches de référence sont cultivées dans le milieu MRS + glucose, supplémenté avec 20 µCi/ml de thymidine tritiée. La radioactivité spécifique de la thymidine tritiée est de 25Ci./mM.

3. - Solutions et tampons.

3.1. Saline-EDTA : NaCl : 0,15 M ; EDTA tétrasodique : 0,1 M dans eau déminéralisée, à pH 8.

3.2. Solution de pronase : 100 mg de pronase sont dissous dans 10 ml de tampon SSC (NaCl : 0,15 M ; citrate trisodique : 15 mM dans eau déminéralisée). La solution est chauffée 10 mn à 80°C, refroidie et conservée à - 20°C.

3.3. Solution alcoolique de dodécylsulfate de sodium (SDS) : SDS : 25 g ; alcool à 20 % q.s.p. 100 ml.

3.4. Tampon Urée 8 M-Phosphate 0,24 M (tampon UP) : Urée : 480 g ; tampon phosphate Na/Na_2 0,48 M, pH 6,5 : 500 ml ; eau déminéralisée q.s.p. 1000 ml. L'urée est dissoute, à chaud, dans le tampon phosphate. Le volume est ajusté à 1000 ml avec l'eau déminéralisée. Le pH final est compris entre 6,8 et 7.

3.5. Tampon phosphate de molarité en Na^+ 24 mM pour la dénaturation thermique : NaH_2PO_4, H_2O : 1,38 g ; Na_2HPO_4, 12 H_2O : 1,79 g ; EDTA tétrasodique : 0,416 g ; eau déminéralisée q.s.p. 1000 ml.

3.6. Tampon de lavage pour hydroxylapatite : SDS : 4 g ; tampon phosphate Na/Na_2, 0,14 M, pH 7 : 1000 ml.

4. - Suspensions d'hydroxylapatite (HA).

4.1. Hydroxylapatite pour purification de l'ADN.

5 g d'hydroxylapatite (Biogel HTP) sont mis en suspension dans 25 ml d'eau déminéralisée et portés à ébullition 15 mn.

Après refroidissement, l'hydroxylapatite est centrifugée à température du laboratoire, à 2000 t/mn pendant 4 mn et lavée

deux fois avec le tampon UP.

4.2. Hydroxylapatite pour hybridations.

A 100 g d'hydroxylapatite très pure (Biogel HTP, DNA Grade) on ajoute 320 ml de tampon phosphate Na/Na_2 1,4 mM. On agite jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Cette suspension est conservée à + 4°C. Au moment de l'utilisation, on homogénéise la suspension et on prélève des fractions de 5 ml que l'on place dans des tubes à centrifuger de 50 ml (SORVALL). L'hydroxylapatite est lavée 2 fois avec 10 ml de tampon de lavage.

5. - Liquide scintillant.

Les filtres radioactifs sont comptés dans 10 ml de liquide scintillant : PPO : 3 g ; POPOP : 0,3 g ; toluène R.P. : 1000 ml.

II. METHODES

1. - Incorporation de thymidine tritiée dans les souches de référence.

Les essais d'incorporation de radioactivité ont été faits avec la souche de Leuconostoc lactis NCDO 546. Dans le milieu MRS, cette souche n'incorpore pas la thymine radioactive, en présence ou en absence de déoxyadénosine. La thymidine radioactive est, par contre, très bien incorporée. La thymidine exogène froide est apportée par l'extrait de levure du milieu (soit 35 µg/ml).

Une pré-culture de la nuit dans 5 ml de milieu MRS contenant 20 uCi/ml de thymidine tritiée sert d'inoculum à 250 ml de milieu MRS supplémenté avec 20 µCi/ml de thymidine tritiée. La culture est arrêtée en début de phase stationnaire

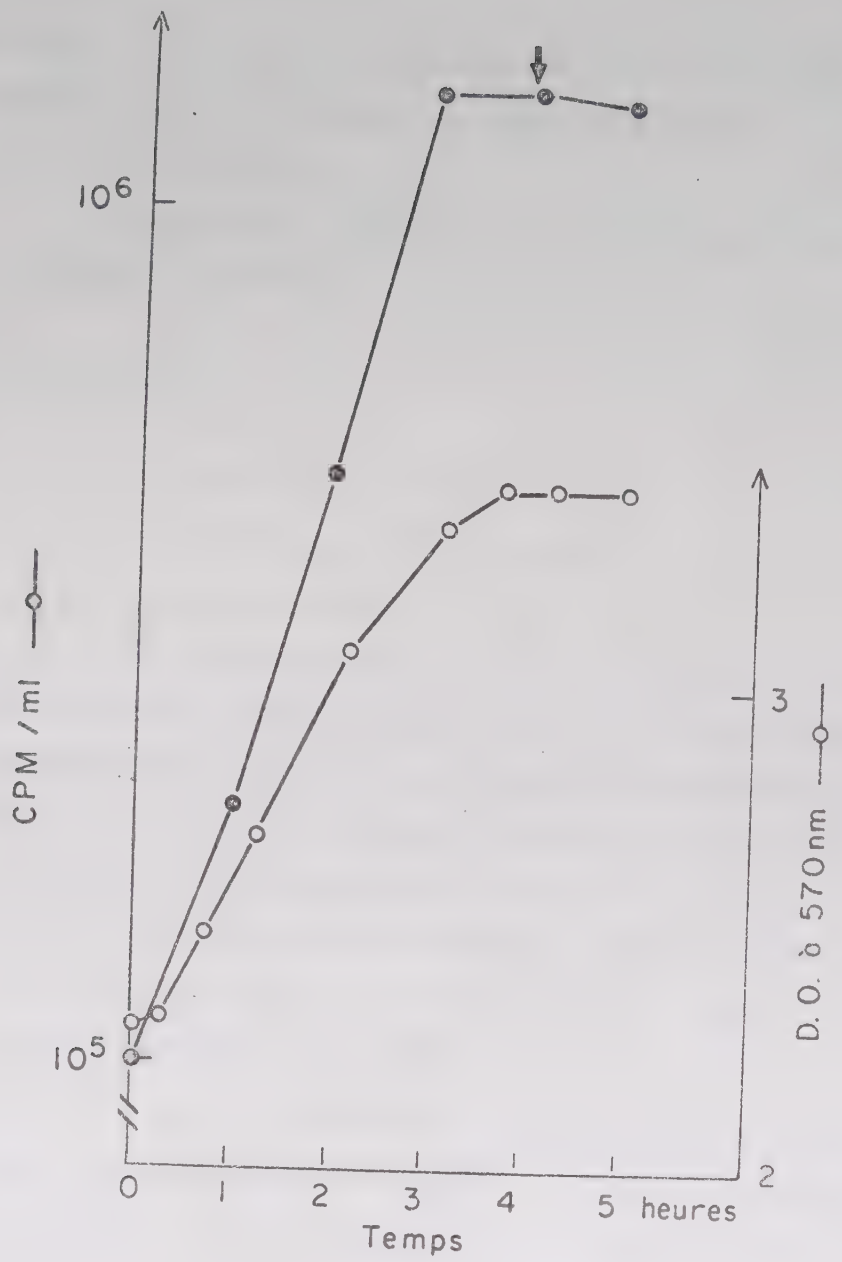


Figure 13 : Incorporation de thymidine tritiée dans l' ADN de la souche L. lactis NCDO 546, en croissance.

A différents temps de la croissance (o—o) on prélève 0,25 ml de culture que l'on place immédiatement dans un tube maintenu à 0°C, contenant 10 ul de NaN_3 M. Après mélange, on en dépose 50 ul et 100 ul sur deux filtres Whatman 3MM, Ø 24 mm, préalablement numérotés. Les filtres sont séchés à l'air et précipités au froid par du TCA 10% + entraineur. Après lavage au TCA 5% et à l'alcool, les filtres sont séchés à l'éther. Le comptage de la radioactivité se fait dans des fioles contenant 10 ml de liquide scintillant.

●——● : radioactivité incorporée (^3H).

(Figure 13) et filtrée sur membrane Millipore HAWP 02500. Les bactéries sont remises en suspension dans un volume minimum de saline-EDTA.

Ce protocole expérimental a été appliqué aux quatre souches de référence.

2. - Extraction de l'ADN.

2.1. Lyse des bactéries.

Les cellules bactériennes, récoltées au début de la phase stationnaire, sont lavées avec du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, et centrifugées à 15 000 g pendant 30 mn à +4°C. 5 g de bactéries (poids humide) sont mis en suspension dans 50 ml de saline-EDTA, pH 8. On ajoute 2 mg/ml de lysozyme et on incube, en agitant, pendant 1 heure à 37°C. On ajoute ensuite 50 µg/ml de pronase et on incube à nouveau à 37°C pendant 30 mn. La lyse des cellules est obtenue après addition de la solution de SDS, à la concentration finale de 2% suivie d'une incubation de 3 heures à 37°C.

Pour certaines souches difficiles à lyser dans ces conditions, on a ajouté, après la solution de SDS, une solution de sarcosinate de sodium à la concentration finale de 1%.

2.2. Déprotéinisation.

Après addition de perchlorate de sodium à concentration molaire, on ajoute au mélange précédent (lysat) un égal volume de mélange chloroforme-alcool isoamylique (24 : 1 - v/v). Après 30 mn d'agitation douce, on centrifuge une heure à 4 000 g. La phase aqueuse supérieure est décantée; elle contient l'ADN en solution.

3. - Purification de l'ADN.

L' ADN obtenu doit être débarrassé de l' ARN et des protéines contaminantes.Il est dialysé pendant une nuit à la température du laboratoire contre le tampon UP. Après dialyse,la solution d' ADN est mise en contact pendant 30 mn avec 5 g d'hydroxylapatite convenablement préparés.Après fixation de l' ADN sur l'hydroxylapatite, on procède à 7 lavages avec,chaque fois, 15 ml de tampon UP, suivis de 4 lavages avec 15 ml de tampon phosphate Na/Na_2 14 mM, pH 7. L'élution de l' ADN bicaténaire est obtenue avec du tampon phosphate K/K_2 0,4 M, pH 7, (3 fois 3 ml).

L' ADN purifié est dialysé :

- pour la dénaturation thermique : contre le tampon phosphate (Na) 24 mM,
- pour les hybridations : contre le tampon phosphate (Na) 0,28M.

4. - Obtention des ADN marqués simples brins.

L' ADN radioactif est extrait et purifié comme l' ADN non marqué.Les doubles brins obtenus de l'hydroxylapatite sont dénaturés par chauffage 10 mn à 100°C, puis rapidement refroidis, ramenés à une molarité de tampon phosphate Na/Na_2 de 0,14 M et mélangés à de l' HA préalablement chauffée à 60°C dans le même tampon. Le surnageant, après centrifugation, contient l' ADN radioactif simple brin.

5. - Dosages des acides nucléiques.

5.1. Dosage de l' ADN.

L' ADN a été dosé chimiquement par la méthode de Burton (65) à la diphénylamine et spectrophotométriquement par mesure de l'absorption à 260 nm sachant qu' un mg/ml d' ADN a une densité optique de 20.

5.2. Dosage de l' ARN.

Le dosage de l' ARN, par la méthode à l'orcinol, a été effectué afin de déceler la présence éventuelle d'une contamination. Dans le cas où une quantité non négligeable d' ARN était présente, l'échantillon, après un traitement par la RNase (100 µg/ml), était soumis à un deuxième cycle de purification sur HA en tampon UP.

6. - Dénaturation thermique et détermination du Tm. Calcul du contenu en G + C.

6.1. Dénaturation thermique.

L' ADN en solution dans le tampon phosphate de dénaturation, à la concentration de 30 à 40 µg/ml, est dénaturé par chauffage lent (élévation de la température de 1 °C toutes les 10 mn) dans un spectrophotomètre Gilford Type 222 A ; la température des cuves et l'absorption à 260 nm sont enregistrées. Une cuve témoin contient une solution de guanine dont l'absorption à 260 nm est d'environ 0,650 unités de D.O. Elle indique les variations de la densité optique dues à l' évaporation et au chauffage de l'appareil. Les valeurs de ces variations seront déduites des valeurs obtenues pour les échantillons.

6.2. Détermination du Tm.

A partir des courbes d'enregistrement de la densité optique et de la température, on trace le graphique représentant le % de dissociation en fonction de la température dont l'équation est :

$$\frac{A - A_o}{A_\infty - A_o} \times 100 = f.\ (\text{température})$$

A_o = absorption à 260 nm, à 25°C.
A_∞ = " " " " " de l' ADN totalement dénaturé.
A = " " " " " de l' ADN à une température donnée - variation de la guanine.

La valeur du Tm (température pour laquelle la moitié des bases de l' ADN sont désappariées) est déterminée graphiquement pour y = 50% de dissociation. Au minimum trois déterminations ont été faites pour chaque ADN.

6.3. Calcul du contenu en G + C.

Le contenu en G + C est calculé à partir de l' équation de Marmur (66) :

$$G + C = 2,44 (Tm - 81,5 - 16,6 \log M)$$

où M représente la molarité en Na^+ du tampon, soit pour le tampon 24 mM utilisé :

$$G + C = 2,44 (Tm - 54°6)$$

7. - Hybridations des acides nucléiques : ADN/ADN.

Les hybridations se font en milieu liquide, à la température optima de renaturation (60°C) et la séparation des simples brins et des doubles brins est obtenue par chromatographie sur hydroxylapatite (HA).

On mélange dans un tube :

- 150 µg d' ADN bicaténaire froid,
- + 0,10 µg d' ADN * simple brin, dans un volume final de 1 ml de tampon phosphate Na/Na_2 0,28 M.

Le mélange des ADN est passé à travers une aiguille de 0,45 mm Ø (aiguille 26 G 1/2, luer lock, montée sur

une seringue tuberculine de 1 ml) à plusieurs reprises afin de casser les brins d' ADN en fragments courts et homogènes. Le mélange est ensuite chauffé 10 mn à 100°C, refroidi rapidement dans la glace, puis incubé à 60°C pendant 16 heures.

A la fin de l'incubation, on ajoute 1 ml d' eau distillée froide et 3 ml de tampon phosphate Na/Na_2 0,14 M. On mélange ces 5 ml à l'hydroxylapatite préalablement équilibrée en tampon phosphate. On incube à 60°C pendant 30 mn pour homogénéiser la température. On centrifuge à la même température de 60°C pendant 3 mn à 4000 t/mn. On recueille le surnageant sur 5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10%, froid, et additionné de 80 à 100 µg/ml d' ADN ou d' ARN entraîneur. Le culot d'hydroxylapatite est lavé trois fois avec le tampon de lavage à 60°C. On élue l' ADN en quatre fois avec, chaque fois, 5 ml de tampon phosphate K/K_2 0,4 M. Tous les surnageants sont recueillis sur 5 ml de TCA à 10% + entraîneur.

Les tubes sont laissés une heure à + 4°C pour une bonne précipitation. Le contenu de chaque tube est filtré sous vide, sur filtres de fibres de verre Whatman GF/C, 2,5 cm Ø. Chaque filtre est lavé avec 10 ml de TCA à 5% puis 5 ml d' alcool. Ils sont séchés à l'éther éthylique avant d'être comptés dans 10 ml de liquide scintillant.

A chaque expérience, on ajoute deux témoins :

- Témoin "100% hybridation" = 150 µg ADN froid homologue + 0,10 µg ADN * homologue.
- Témoin "0% hybridation" = 0,10 µg ADN * homologue.

On détermine les valeurs suivantes :

-cpm totaux = cpm élutions tampons de lavages + cpm élutions tampons phosphate K/K_2 0,4 M.

- cpm hybrides = cpm élutions tampon phosphate K/K_2 0,4 M.

$$\% \text{ hybrides "bruts"} = \frac{\text{cpm hybrides}}{\text{cpm totaux}} \times 100$$

$$\% \text{ hybrides} = \frac{\% \text{ "bruts"} - \% \text{ témoin } 0\%}{\% \text{ témoin } 100\%}$$

III. RESULTATS

1. Détermination du Tm et du contenu en G + C.

Pour chacune des 50 souches de Leuconostoc, l' ADN a été isolé, purifié, et sa température de fusion (Tm) a été déterminée. A partir de l'enregistrement simultané de la température et de la densité optique à 260 nm, nous avons tracé la courbe du pourcentage de dénaturation en fonction de la température (Figure 14).

Le Tableau XVIII rassemble les valeurs moyennes des Tm obtenues pour les différents ADN et les valeurs correspondantes du contenu en G + C calculées d'après l'équation de Marmur.

Les valeurs extrêmes du contenu en G + C des souches de Leuconostoc vont de 36,1 pour la souche de Leuconostoc paramesenteroides NCDO 872 à 45,9 pour la souche de Leuconostoc lactis NCDO 546. Ces valeurs sont comparables à celles trouvées par E. Garvie pour 12 souches de Leuconostoc (67).

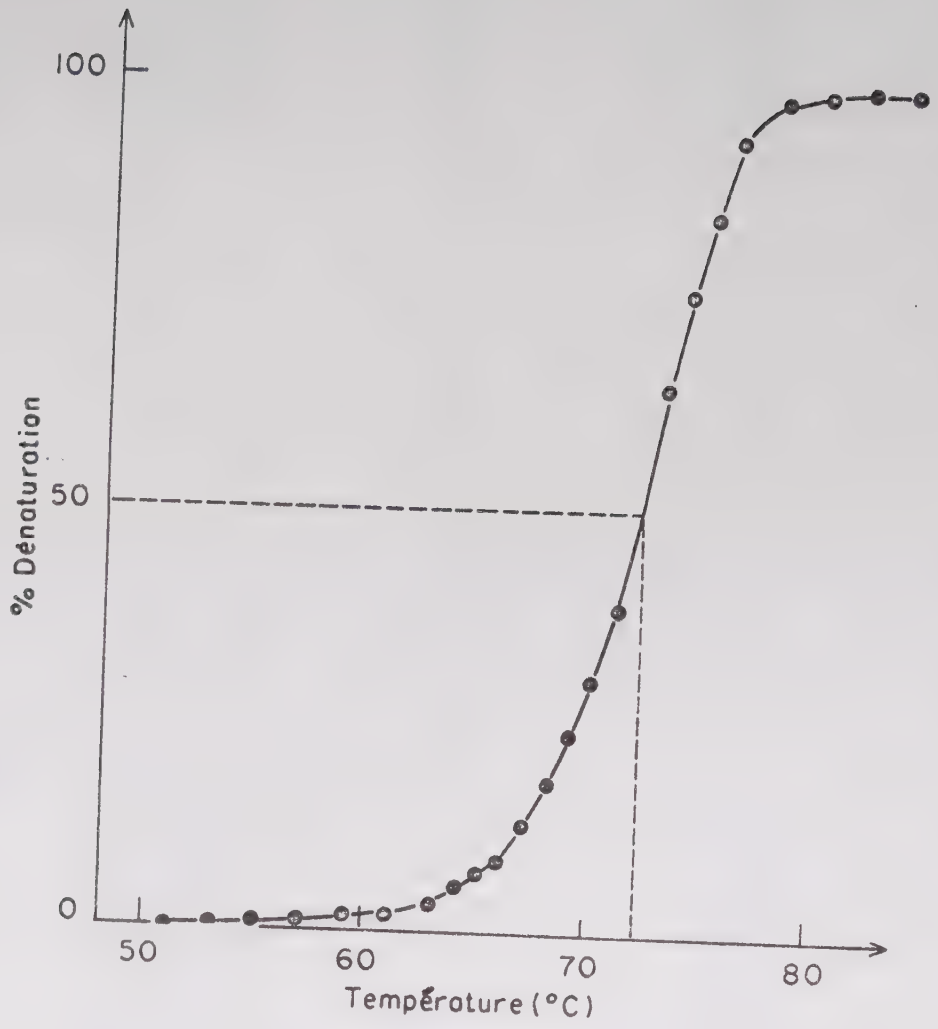


Figure 14 : Courbe de dénaturation thermique de l'ADN de la souche NCDO 546.

Souches		Tm (valeur moyenne)	GC %
L. cremoris	NCDO 543	70°8	39,6
	NCDO 829	71°1	40,4
L. lactis	NCDO 532	72°9	44,6
	NCDO 533	71°2	40,7
	NCDO 534	72°3	43,1
	NCDO 535	72°8	44,2
	NCDO 536	73°	44,8
	NCDO 546	73°4	45,9
	NCDO 549	73°	44,8
	NCDO 956	71°1	40,4
	NCDO 959	72°6	43,8
L. paramesenteroides	NCDO 803	71°2	40,6
	NCDO 870	71°	40
	NCDO 871	70°5	38,8
	NCDO 872	69°4	36,1
	NCDO 873	70°2	38
	NCDO 885	69°8	37,1
	NCDO 886	69°8	37,1
	NCDO 955	71°2	40,6
	CIP 54169	70°2	38
L. dextranicum	NCDO 517	71°	40
	NCDO 529	71°3	40,8
	NCIB 3739	72°3	43,2
	NCIB 2706	71°7	41,7
	NCIB 3356	71°8	42
	NCDO 812	71°8	42
L. mesenteroides	NCDO 768	70°1	37,8
	NCDO 882	70°5	38,8
	NCIB 9317	70°5	38,8
	NCIB 3351	70°9	39,9
	CIP 54171	71°8	42,1
	ATCC 10830	71°2	40,7
	NCIB 8710	71°4	41
	Le 512-17	72°8	44,2
	NCDO 523	71°1	40,4
	NCIB 8013	71°5	41,2
	NCIB 9319	72°	42,4
	V 16	70°6	38,9
	CIP 54168	71°7	41,7
	1533	72°	42,4
	Le 513-7	72°	42,4
	NCDO 522	72°1	42,8
	CIP 54170	71°7	41,7
	Le 513-12	70°4	38,6
	Le 512-13	70°4	38,6
L. oenos	ATCC 23278	72°	42,4
	WLBG 31	70°6	39
	WLD 1	70°6	39
	SC 122	69°9	37,3

Tableau XVIII : Valeurs des températures de fusion et des contenus en G + C de l'ADN des souches de *Leuconostoc*.

2. - Hybridations à partir de l' ADN de Leuconostoc lactis NCDO 546.

L' ADN de la souche NCDO 546, marqué à la thymidine tritiée (radioactivité spécifique : 40.000 cpm/µg) a été hybridé successivement avec l' ADN non marqué de toutes les souches à l'étude, dans le rapport de concentration : 0,10 µg/ 150 µg.

Les taux d'hybridation sont rassemblés dans le Tableau XIX. Les témoins homologues "100% hybridation" varient de 88 à 93,6 % , les témoins "0% hybridation" varient de 2,2 à 7,5 %.

3. - Hybridations à partir de l' ADN de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768.

L' ADN de la souche NCDO 768, marqué à la thymidine tritiée (radioactivité spécifique : 80.000 cpm/µg) a été hybridé successivement avec l' ADN non marqué de toutes les souches à l'étude , dans le rapport de concentration : 0,10 µg/ 150 µg.

Les taux d'hybridation sont rassemblés dans le Tableau XX. Les témoins homologues "100% hybridation" varient de 91,8 à 95,7 % ; les témoins "0% hybridation" varient de 5,8 à 8,6 % .

4. - Hybridations à partir de l' ADN de Leuconostoc mesenteroides NCDO 523.

L' ADN de la souche NCDO 523, marqué à la thymidine tritiée (radioactivité spécifique : 150.000 cpm/µg) a été hybridé successivement avec l' ADN non marqué de toutes les souches de Leuconostoc mesenteroides, de toutes les souches

Souches		% hybridation/ ADN ^{3}H *L. lactis* NCDO 546
L. lactis	NCDO 546	100
	NCDO 532	91,2
	NCDO 533	79,4
	NCDO 534	86,4
	NCDO 535	88,8
	NCDO 536	73,6
	NCDO 549	78,9
	NCDO 956	94,9
	NCDO 959	82,9
L. cremoris	NCDO 543	25,4
	NCDO 829	24
L. dextranicum	NCDO 517	18,7
	NCDO 529	35,3
	NCIB 3739	23,2
	NCIB 2706	29,7
	NCIB 3356	28,8
	NCDO 812	30,2
L. mesenteroides	NCIB 9317	56,4
	CIP 54171	20
	NCIB 3351	27,9
	NCDO 768	36
	NCDO 882	24,8
	ATCC 10830	19,4
	NCIB 8710	23,4
	Le 512-17	29
	NCDO 523	28,2
	NCIB 8013	29,7
	NCIB 9319	30,5
	V 16	24,5
	CIP 54168	19,9
	1533	27
	Le 513-7	22,2
	NCDO 522	25,2
	CIP 54170	20,2
	Le 513-12	23,2
	Le 512-13	26,9
L. paramesenteroides	NCDO 803	11,8
	NCDO 870	10,6
	NCDO 871	11,9
	NCDO 872	10,9
	NCDO 873	9,7
	NCDO 885	8,7
	NCDO 886	12,2
	NCDO 955	6,2
	CIP 54169	12,6
L. oenos	ATCC 23278	8,5
	WLBG 31	12,1
	WLD 1	19,7
	WLB 6	22,4
	SC 122	24,2

Tableau XIX : Pourcentages d'hybridation des ADN des souches de *Leuconostoc* avec l'ADN marqué au ^{3}H de la souche *L. lactis* NCDO 546.

Souches		% hybridation/ ADN ^{3}H de *L. mesenteroides* NCDO 768
L. mesenteroides.....	NCDO 768	100
	NCDO 882	88,9
	NCIB 9317	54,1
	NCIB 3351	38,4
	CIP 54171	40,2
	ATCC 10830	38,3
	NCIB 8710	32,6
	Le 512-17	52,8
	NCDO 523	34,8
	NCIB 8013	42
	NCIB 9319	40,1
	V 16	43,3
	CIP 54168	43,6
	1533	39,4
	Le 513-7	36,6
	NCDO 522	39,5
	CIP 54170	38,4
	Le 513-12	34,5
	Le 512-13	43,1
L. cremoris	NCDO 543	46,3
	NCDO 829	44,9
L. dextranicum	NCDO 517	39,6
	NCDO 529	37,7
	NCIB 3739	44,8
	NCIB 2706	48,7
	NCIB 3356	39,4
	NCDO 812	42,2
L. lactis	NCDO 532	61,2
	NCDO 533	44,6
	NCDO 534	41,4
	NCDO 535	60,7
	NCDO 536	51,2
	NCDO 546	39,2
	NCDO 549	27,8
	NCDO 956	61
	NCDO 959	55
L. paramesenteroides	NCDO 803	17
	NCDO 870	14,7
	NCDO 871	12,8
	NCDO 872	17
	NCDO 873	18,4
	NCDO 885	15,5
	NCDO 886	17,5
	NCDO 955	20,9
	CIP 54169	22,1
L. oenos	ATCC 23278	10,3
	WLBG 31	18
	WLD 1	17,3
	WLB 6	10,4

Tableau XX : Pourcentage d'hybridation des ADN des souches de *Leuconostoc* avec l'ADN marqué au ^{3}H de *L. mesenteroides* NCDO 768

de Leuconostoc cremoris et Leuconostoc dextranicum, de trois souches de Leuconostoc lactis , de deux souches de Leuconostoc paramesenteroides et d'une souche de Leuconostoc oenos.

Les taux d'hybridation sont rassemblés dans le Tableau XXI. Les témoins homologues "100% hybridation" varient de 93 à 95% ; les témoins "0% hybridation" varient de 9 à 11%.

5. - Hybridations à partir de l' ADN de Leuconostoc paramesenteroides NCDO 803.

L''ADN de la souche NCDO 803, marqué à la thymidine tritiée (radioactivité spécifique : 180.000 cpm/µg) a été hybridé successivement avec l' ADN non marqué de toutes les souches de Leuconostoc paramesenteroides et un échantillonnage des souches des autres espèces.

Les taux d'hybridation sont rassemblés dans le Tableau XXII. Les témoins homologues "100% hybridation" varient de 91 à 94,3 % ; les témoins "0% hybridation" varient de 4,5 à 6,8 % .

IV. DISCUSSION

Nous avons caractérisé les ADN des souches de Leuconostoc par leur température de fusion et leur contenu en G + C. Les résultats sont rapportés dans le Tableau XVIII ; les valeurs extrêmes, pour le contenu en G + C, sont : 36,1 % et 45,9 %. Les valeurs les plus faibles se trouvent dans le groupe des Leuconostoc paramesenteroides et les valeurs les plus élevées dans le groupe des Leuconostoc lactis. Des valeurs intermédiaires sont trouvées pour les souches de Leuconostoc mesenteroides. Un histogramme des valeurs du contenu en G + C (Figure 15) montre une distribution symétrique avec

Souches		% hybridation/ADN ^{3}H de *L.mesenteroides* NCDO 523
L. mesenteroides	NCDO 523	100
	NCIB 8013	99,1
	ATCC 10830	96,5
	NCIB 8710	94,6
	1533	93,5
	CIP 54170	92,7
	V 16	91,7
	NCDO 522	90,8
	Le 513-7	89,9
	Le 512-17	89,1
	NCIB 9317	88,9
	CIP 54168	88,4
	NCIB 9319	87,8
	Le 513-12	86,7
	Le 512-13	85,8
	NCDO 768	45,6
	NCDO 882	78
	NCIB 3351	33,9
	CIP 54171	38
L. dextranicum	NCDO 517	84,9
	NCDO 529	89,8
	NCIB 3739	90,1
	NCIB 2706	85,8
	NCIB 3356	88,7
	NCDO 812	91,6
L. cremoris	NCDO 543	77,6
	NCDO 829	83,8
L. lactis	NCDO 546	41,5
	NCDO 533	32,1
	NCDO 959	46,7
L. paramesenteroides	NCDO 803	11,4
	NCDO 870	16,2
L. oenos	ATCC 23278	11,2

Tableau XXI : Pourcentages d'hybridation des ADN des souches de *Leuconostoc* avec l'ADN marqué au ^{3}H de *L. mesenteroides* NCDO 523

Souches		% hybridation/ADN ^{3}H de *L. paramesenteroides* NCDO 803
L. paramesenteroides	NCDO 803	100
	NCDO 870	86,5
	NCDO 871	85,7
	NCDO 872	89
	NCDO 873	82
	NCDO 885	56,5
	NCDO 886	60,4
	NCDO 955	59,6
	CIP 54169	27,4
L. lactis	NCDO 546	24,8
	NCDO 533	9,4
	NCDO 956	8,7
L. cremoris	NCDO 543	6,7
	NCDO 829	8,1
L. dextranicum	NCDO 517	6,7
	NCDO 529	18,7
	NCDO 812	5,2
L. mesenteroides	NCIB 3351	8,7
	NCIB 9317	8,6
	NCDO 768	22
	NCDO 882	14,2
	NCDO 523	18,3
	ATCC 10830	6,8
	CIP 54168	8,1
	NCDO 522	12,9
L. oenos	ATCC 23278	4,8

Tableau XXII : Pourcentages d'hybridation des ADN des souches de *Leuconostoc* avec l'ADN marqué au ^{3}H de *L. paramesenteroides* NCDO 803.

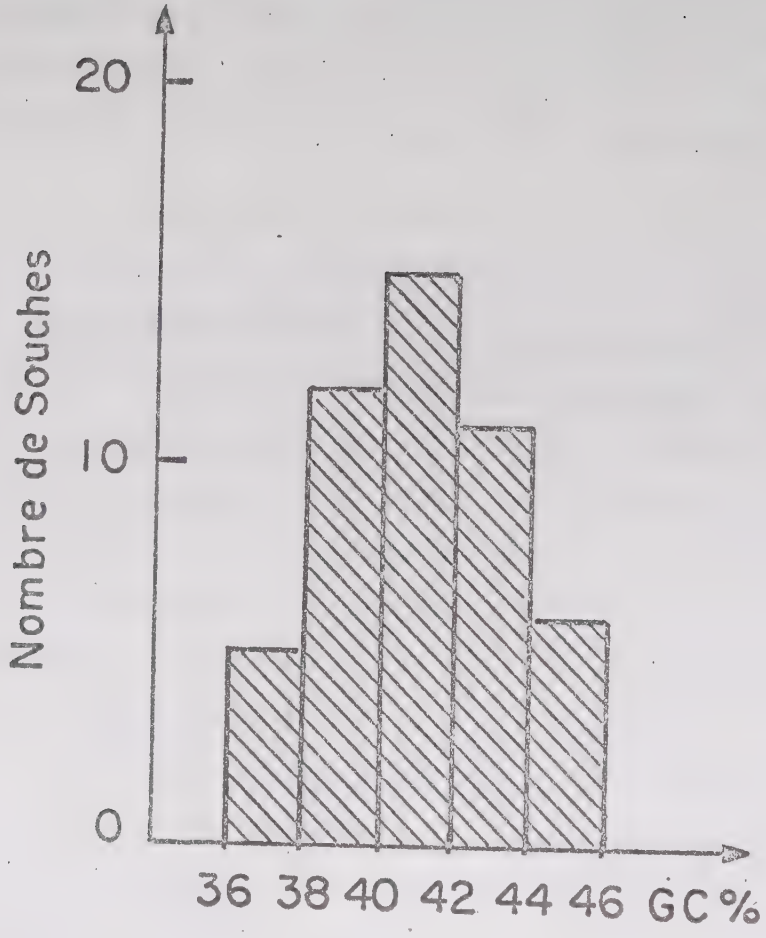


Figure 15 : Répartition des souches de Leuconostoc en fonction du contenu en G + C de leur ADN.

un pic pour les valeurs de 40 à 42 %. D'après les estimations de Jones et Sneath (68) qui considèrent que la variation à l'intérieur d'une espèce bien définie se situe autour de 2,5 % (rarement plus de 4 %), on peut diviser les Leuconostoc en quatre espèces : Leuconostoc paramesenteroides, Leuconostoc mesenteroides et Leuconostoc lactis citées précédemment et Leuconostoc oenos dont les particularités métaboliques ou biochimiques rappelées au Chapitre II sont assez nettes pour faire de ce groupe de "souches acidophiles" une espèce à part.

Le choix des souches de référence a été fait d'une part en fonction de l'étude immunologique des enzymes (souches L. lactis NCDO 546 et L. mesenteroides NCDO 768),d' autre part en fonction de la taxonomie classique (souche-type de l'espèce L. paramesenteroides NCDO 803 et souche-type de l'espèce L. mesenteroides NCDO 523). Les résultats obtenus avec chaque référence sont présentés dans les Tableaux XIX, XX, XXI, XXII. Nous voyons que tous les ADN testés ont donné des hybrides avec les ADN de référence ce qui signifierait que l'on est en présence d'un genre unique. Toutefois, certains groupes comme celui de Leuconostoc oenos donnent des pourcentages d'hybridation très faibles. On remarque également que le groupe homologue, pour un ADN de référence, présente une très grande homogénéité tandis que pour les groupes hétérologues nous avons une variation presque continue des valeurs des pourcentages d'hybridation.

A partir de la souche de L. lactis NCDO 546, le groupe homologue, contenant uniquement des souches de Leuconostoc lactis, présente de 73,6 % à 100 % d'hybridation. A partir de la souche de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768, le groupe homologue contient uniquement deux souches de L. mesenteroides: NCDO 768 et NCDO 882, avec respectivement 100 % et 88,9 % d'hybridation. Toutes les autres souches de L. mesenteroides sont

exclues de ce groupe homologue et ne présentent que 32 % à 54 % d' homologie avec la souche NCDO 768. A partir de la souche de Leuconostoc mesenteroides NCDO 523, nous avons un important groupe homologue présentant de 78 % à 100 % d' hybridation. Ce groupe est très hétérogène : il comprend une grande partie des souches de L. mesenteroides sauf NCDO 768 et NCDO 882 déjà citées ainsi que CIP 54171 et NCIB 3351 qui ne présentent que 38 % et 34 % d'hybridation; cependant on trouve dans ce groupe toutes les souches de Leuconostoc cremoris (77,6 % à 83,8 % d'hybridation) et toutes les souches de Leuconostoc dextranicum (84,9 % à 91,6 % d'hybridation). A partir de la souche de Leuconostoc paramesenteroides NCDO 803, les résultats, au sein de ce groupe, ne sont pas aussi homogènes puisque nous avons des valeurs allant de 27,4 % à 100 %. La souche CIP 54169, donnant 27,4 % d'hybridation,est répertoriée à la Collection de l'Institut Pasteur et à l' ATCC comme souche de L. mesenteroides ce qui pourrait expliquer ce résultat; cependant,au cours de l'étude immunologique cette souche a été classée dans les groupes f et f'. Les autres souches de L. paramesenteroides se subdivisent en deux : les souches donnant de 82 à 100 % d'hybridation et les souches donnant de 56,5 à 60,4 % d' hybridation.

Lorsqu'on examine les groupes hétérologues, on remarque tout de suite les pourcentages très faibles pour les souches de Leuconostoc oenos, cette espèce apparait très éloignée des autres espèces de Leuconostoc. Les souches de Leuconostoc paramesenteroides présentent aussi des pourcentages faibles vis-à-vis des trois références : NCDO 546, NCDO 768, et NCDO 523. Réciproquement, les souches hétérologues donnent des pourcentages d'hybridation faibles avec L. paramesenteroides NCDO 803 (de 6 à 20 %). Ces résultats montrent que le groupe

Leuconostoc paramesenteroides est le plus éloigné au point de vue évolutif des groupes de Leuconostoc. D'autre part, dans aucun des cas, les souches de Leuconostoc cremoris et Leuconostoc dextranicum se distinguent de la majorité des souches de Leuconostoc mesenteroides; un cas identique est représenté par Lactobacillus bulgaricus et Lactobacillus lactis (84,12,15) dont les caractères fermentaires sont très différents mais qui présentent de forts pourcentages d'hybridation réciproques.

L' analyse des différents groupes - homologues et hétérologues - montre l'existence de 6 groupes d'hybridation:

- Groupe 1 : Souches de Leuconostoc lactis - + de 70 % d'hybridation avec l'ADN de la souche NCDO 546.
- Groupe 2 : Souches de Leuconostoc paramesenteroides - + de 50 % d'hybridation avec l'ADN de la souche NCDO 803.
- Groupe 3 : Souches de Leuconostoc mesenteroides (sauf NCDO 768,NCDO 882,CIP 54171 et NCIB 3351) et souches de Leuconostoc cremoris et dextranicum - + de 78 à 80 % d'hybridation avec l'ADN de la souche NCDO 523.
- Groupe 4 : Souches de Leuconostoc mesenteroides - + de 80 % d'hybridation avec l'ADN de la souche NCDO 768.
- Groupe 5 : Souches de Leuconostoc mesenteroides - - de 50 % d'hybridation avec l'ADN de la souche NCDO 523.
- Groupe 6 : Souches de Leuconostoc oenos - - de 10 % d'hybridation avec les ADN des souches NCDO 546, NCDO 768, NCDO 803 et NCDO 523.

DISCUSSION GENERALE

Les taxonomistes et les biologistes intéressés dans l'étude de l'évolution ont besoin de méthodes faciles et rapides leur permettant de déterminer le degré de ressemblances des séquences entre protéines isofonctionnelles. En effet, les variations de séquences primaires reflètent très correctement les changements évolutifs (Dayhoff,8). Dès 1966, l'utilisation de techniques immunologiques quantitatives (précipitation ou micro-fixation du complément) pour la comparaison des protéines a été proposée. Cette proposition était basée sur le fait que les substitutions d'acides aminés se reflétaient par des différences dans les propriétés immunologiques. Il revient à Prager et Wilson (6) d'avoir montré au cours de l'étude des lysozymes aviaires qu'il existe une relation linéaire entre le nombre d'acides aminés substitués et la distance immunologique* (4). En régle générale chez les organismes supérieurs, la réactivité croisée disparait lorsque les séquences différent de plus de 30 à 40%.

Par ailleurs,un parallélisme a été établi entre les données immunologiques sur des protéines et certains arguments classiques étayant l'évolution des espèces.Ainsi,les réactions croisées de l'albumine sérique de singes appartenant à 22 espèces différentes ont été comparées,par fixation du complément,à celle de l'homme. L'intensité des réactions croisées

* La distance immunologique est exprimée par la formule : 100 x log de l'indice de dissimilarité. L'indice de dissimilarité est le facteur déterminé expérimentalement par lequel on doit augmenter la concentration de l'antisérum pour qu'un antigène hétérologue donne une courbe de fixation du complément d'une hauteur identique à celle de l'homologue (4).

mesurées en indice de dissimilarité est très voisine pour chacune des espèces du même genre.De plus, la distance immunologique ainsi évaluée reproduit l'ordre de similitude que l'on peut déduire de l'anatomie comparée de ces animaux : Homme, Hominidés, Cercopithèques, Ceboïdea (singes du Nouveau Monde),Prosimiens,(4, 88).

La relation des distances immunologiques,d' une part avec les séquences primaires des protéines, d'autre part avec les données de l'anatomie comparée, montre que l' immunologie des protéines isofonctionnelles est une approche tout à fait valable de la variation des séquences primaires et des rapports évolutifs entre organismes.

ETUDES IMMUNOLOGIQUES D' ENZYMES CHEZ LES BACTERIES.

Dans le cas des Procaryotes, il n'existe aucune donnée directe concernant les rapports évolutifs des microorganismes. Aussi, à la lumière des concepts de Wilson, plusieurs chercheurs ont abordé l'étude immunologique de protéines isofonctionnelles à l'intérieur de certains groupes bactériens. Deux buts étaient poursuivis : l'un était de se faire une idée des rapports évolutifs à l'intérieur de chaque groupe bactérien, l'autre était de déterminer l'utilité éventuelle de cette approche pour révéler des catégories taxonomiques.

De telles études ont été abordées chez trois groupes bactériens : Entérobactéries, Pseudomonas et bactéries lactiques. Chez les Entérobactéries, les principaux travaux sont ceux de Cocks et Wilson en 1972 (16). Ces auteurs ont comparé qualitativement et quantitativement les phosphatases alcalines à partir de deux sérums spécifiques préparés contre les phosphatases alcalines d' Escherichia coli et de Klebsiella

aerogenes. Les résultats montrent que les genres (que nous pourrions appeler "mini-genres" dans le cas des Entérobactéries puisque souvent représentés par une seule espèce comme dans le cas d' Escherichia) Escherichia, Shigella, Salmonella, Arizona, Citrobacter et Klebsiella sont proches phylogénétiquement et se différencient des Enterobacter et Serratia d' une part, des Proteus et Erwinia d'autre part. Ces résultats ont confirmé les résultats des hybridations ADN-ADN faites par Brenner et col. (85).

Chez les Pseudomonas, Stanier et col. (11) ont préparé, en 1970, des sérums anti-muconolactonase et anti-muconolactone isomerase de Pseudomonas putida biotype A. Ces deux enzymes inductibles ne sont pas présents chez toutes les espèces de Pseudomonas. Leur étude immunologique a permis de montrer que Pseudomonas putida biotype A était assez différent de Pseudomonas putida biotype B. Ce dernier a été rapproché du groupe P. fluorescens. Ces résultats ont été confirmé par les hybridations ADN-ADN (86).

Si pour les Entérobactéries, les caractères usuels de la taxonomie classique permettent de distinguer assez clairement les espèces, cela n'était pas aussi net chez les bactéries lactiques (Streptococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus). On connait encore peu de choses sur les homologies de séquences des acides nucléiques de ces bactéries (83,84). Par contre, les données immunologiques sur les enzymes isofonctionnels sont importantes.

Chez les Lactobacillus, Gasser et col. (12), en 1970, ont comparé d'une part les D-lactate déshydrogénases, d'autre part les L-lactate déshydrogénases. A chaque groupe de spécificité identique pour l'un ou l'autre enzyme correspond une valeur bien définie du contenu en G + C de l'ADN. Nous notons que ces deux enzymes ne sont pas présents chez tous les Lactobacillus;

certains Lactobacillus possédent uniquement une D-LDH, d' autres uniquement une L-LDH, d'autres,enfin, possédent à la fois une D-LDH et une L-LDH. Pour les espèces qui possédent à la fois une D-LDH et une L-LDH, l'étude séparée des réactions croisées de ces deux enzymes a établi des groupements de souches rigoureusement identiques. L' ensemble de ce travail a permis une meilleure définition des espèces et la confirmation de l'espèce nouvellement décrite : Lactobacillus jensenii (87). Des cartes phylogéniques ont pu être tracées (Figure 16) et les relations évolutives entre deux genres différents - Lactobacillus et Leuconostoc - démontrées.
London et col. ont montré la relation phylogénique entre Streptococcus faecalis et Lactobacillus casei en étudiant un enzyme spécifique de ces deux espèces : l'enzyme malique (13, 14, 75). Un argument d'ordre biochimique appuie,par ailleurs, cette parenté : les propriétés des L-LDH de ces deux espèces. En effet, si les L-LDH des Streptococcus (80, 81, 82) sont en régle générale activées par le fructose-1,6-diphosphate et présentent une régulation allostérique, seule la L-LDH de Lactobacillus casei (78, 79) présente les mêmes caractéristiques chez les Lactobacillus. Lactobacillus casei se situe,probablement, à un embranchement évolutif intermédiaire entre les Streptocoques et les Lactobacilles. En effet, malgré ses originalités fonctionnelles, la L-LDH de Lactobacillus casei donne une réaction croisée avec le sérum anti-L-LDH de Lactobacillus acidophilus (12). L'étude ultérieure des aldolases de bactéries lactiques par London et col. (15, 76) a montré l'origine phylogénique commune et le degré de relations des enzymes isofonctionnels de Streptococcus, Lactobacillus, Pediococcus - dans le groupe des bactéries lactiques - mais aussi des aldolases de Microbacterium thermosphactum, Butyribacterium, Eubacterium et Propionibacterium (Figure 17).London a souligné

la cohérence entre les cartes des relations antigéniques résultant de l'étude des D-LDH (Figure 16) et celles résultant de l'étude des aldolases (Figure 17).Toutefois,l'aldolase n'est présente que chez les bactéries lactiques homofermentaires d'où le manque de renseignements pour les bactéries lactiques hétérofermentaires. L'étude de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase présente chez toutes les bactéries lactiques est en cours (London, communication à la Société américaine de Microbiologie, Atlantic City, mai 1976). Il faut souligner, à la suite de ces travaux, l'avantage que présente l'étude immunologique d'un enzyme isofonctionnel par rapport aux hybridations ADN-ADN. En effet, les aldolases de Streptococcus faecalis (groupe D) et Streptococcus lactis (groupe N) donnent de très fortes réactions croisées et un index de dissimilarité assez faible. Par contre, l'hybridation ADN-ADN ne donne que 3 à 4 % d'homologie entre ces deux espèces (83). L' étude immunologique des enzymes isofonctionnels constitue, donc,un outil très puissant pour l'approche de la phylogénie bactérienne qui était restée spéculative jusqu'à ces dernières années faute de moyen d'étude valable.

ETUDE DU GENRE LEUCONOSTOC.

Nous avons choisi le genre Leuconostoc pour deux raisons :

- Tout d'abord, les réactions croisées des sérums anti-D-LDH de Lactobacillus avec les extraits bruts de plusieurs souches de Leuconostoc avaient établi l'existence d'un lien phylogénique entre des bactéries de physiologie très voisine mais de morphologie très différente.
- Ensuite, ce groupe nous a semblé un bon choix pour montrer la validité de l'étude immunologique appliquée à la taxonomie puisque sa classification par les techniques usuelles était

très confuse (Tableau Ia, Garvie - 18).

Notre recherche avait pour but de répondre à deux questions :

1. - Est-ce que les groupements de souches déterminés par les réactions croisées d'un sérum anti-protéine A seront identiques à ceux déterminés par un sérum anti-protéine B - les protéines A et B étant isolées d'une même souche bactérienne ?

2. - Si oui, quel rapport existe-t-il entre l'étude du produit de deux gènes par comparaison immunologique et l'étude de la totalité du génome par hybridation ADN-ADN ?

Pour répondre à la première question, nous avons choisi deux enzymes de la voie catabolique essentielle, présents chez tous les Leuconostoc : D-lactate déshydrogénase et glucose-6-phosphate déshydrogénase. Le Tableau XVII du chapitre III montre la parfaite concordance des groupements de souches avec les deux sérums anti-enzymes. L'évolution de la D-LDH et de la G-6-PDH chez les Leuconostoc est coordonnée, et l'analyse des relations immunologiques pour un seul enzyme , chez les différentes espèces , donne une première indication sur les rapports évolutifs entre ces espèces. D'après nos résultats, Lactobacillus viridescens semble faire le lien entre les Lactobacilles hétérofermentaires et les Leuconostoc. E. Garvie apporte de nombreux arguments pour le rapprochement de ces espèces (67, manuscrit en cours de publication).

La réponse à la deuxième question est apportée par le Tableau XXIII où l'on remarque la parfaite concordance des groupes immunologiques et des groupes d'hybridation. Nous noterons seulement la nécessité d'avoir de nombreux points de référence dans le cas des hybridations pour définir les grou-

Souches	% hybridation avec ADN ^3H de				Groupe immunologiqu
	ADN 546*	ADN 768*	ADN 523*	ADN 803*	
NCDO 546	100	39,2	41,5	24,8	a'
NCDO 956	94,9	61	46,7	8,7	a'
NCDO 532	91,2	61,2	-	-	a'
NCDO 535	88,8	60,7	-	-	a'
NCDO 534	86,4	41,4	-	-	a'
NCDO 959	82,9	55	-	-	a'
NCDO 533	79,4	44,6	32,1	9,4	a'
NCDO 549	78,9	27,8	-	-	a'
NCDO 536	73,6	51,2	-	-	a'
NCDO 768	36	100	45,6	22	e'
NCDO 882	24,8	88,9	78	14,2	e'
CIP 54171	20	40,2	38	-	b'
NCIB 3351	27,9	38,4	33,9	8,7	b'
NCDO 523	28,2	34,8	100	18,3	d'
NCIB 8013	29,7	42	99,1	-	d'
ATCC 10830	19,4	38,3	96,5	6,8	d'
NCIB 8710	23,4	32,6	94,6	-	d'
1533	27	39,4	93,5	-	d'
CIP 54170	20,2	38,4	92,7	-	d'
V 16	24,5	43,3	91,7	-	d'
NCDO 522	25,2	39,5	90,8	12,9	d'
Le 513-7	22,2	36,6	89,9	-	d'
Le 512-17	29	52,8	89,1	-	d'
NCIB 9317	56,4	54,1	88,9	8,6	d'
CIP 54168	19,9	43,6	88,4	8,1	d'
NCIB 9319	30,5	40,1	87,8	-	d'
Le 513-12	23,2	34,5	86,7	-	d'
Le 512-13	26,9	43,1	85,8	-	d'
NCDO 517	18,7	39,6	84,9	6,7	d'
NCDO 529	35,3	37,7	89,8	18,7	d'
NCIB 3739	23,2	44,8	90,1	-	d'
NCIB 2706	29,7	48,7	85,8	-	d'
NCIB 3356	28,8	39,4	88,7	-	d'
NCDO 812	30,2	42,2	91,6	5,2	d'
NCDO 543	25,4	46,3	77,6	6,7	d'
NCDO 829	24	44,9	83,8	8,1	d'
NCDO 803	11,8	17	11,4	100	f'
NCDO 870	10,6	14,7	16,2	86,5	f'
NCDO 871	11,9	12,8	-	85,7	f'
NCDO 872	10,9	17	-	89	f'
NCDO 873	9,7	18,4	-	82	f'
NCDO 885	8,7	15,5	-	56,5	f'
NCDO 886	12,2	17,5	-	60,4	f'
NCDO 955	6,2	20,9	-	59,6	f'
CIP 54169	12,6	22,1	-	27,4	f'
ATCC 23278	8,5	10,3	11,2	4,8	G

Tableau XXIII : Résultats des hybridations et de l'immunologie de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de la souche NCDO 768.

pes homologues. Un seul sérum anti-enzyme donne les mêmes renseignements que plusieurs ADN de référence pour les hybridations. En outre, une étude qualitative en immunodiffusion donne des renseignements sur les relations entre les différents groupes (ordre de similarité décroissante). Au moment où nous rédigions ce texte, nous avons reçu un manuscrit d' E. Garvie portant sur les hybridations ADN-ADN entre Leuconostoc et Lactobacilles hétérofermentaires. Ses résultats sont tout à fait superposables aux nôtres bien qu'obtenus par une technique différente (technique sur filtres). Seize souches de Leuconostoc ont été étudiées par E. Garvie, avec les trois ADN de référence suivants : NCDO 546, NCDO 523, NCDO 803 ; nous donnons dans le Tableau XXIV les résultats communs :

Souches	ADN de référence					
	546*		523*		803*	
	E.G.**	M.H.***	E.G.	M.H.	E.G.	M.H.
NCDO 546	100	100	49	42	46	25
NCDO 533	85	79	58	32	-	10
NCDO 803	13	12	6	11	100	100
NCDO 871	14	13	19	16	87	87
NCDO 523	36	28	100	100	9	18
NCDO 768	38	36	48	46	10	22
NCDO 797*	32	56	80	89	12	9
NCDO 529	22	35	110	90	-	18
NCDO 812	25	30	84	92	-	5
NCDO 543	29	25	66	78	-	7

*NCDO 797 = NCIB 9317 ; **E.G. = E. Garvie ; ***M. Hontebeyrie

Tableau XXIV : Résultats comparés d'hybridation des ADN chez les Leuconostoc.

La notion d'espèce bactérienne.

Les critères taxonomiques propres à définir l'espèce bactérienne ne sont pas encore clairement définis. Sans préjuger de ces critères donnant les limites de l'espèce bactérienne, nous désignerons, ainsi, l'unité élémentaire de la Systématique bactérienne.

Chez les Eucaryotes, l'unité élémentaire de la Systématique peut se définir de façon précise par la possibilité de formation d'hybrides entre deux individus de polarité opposée. Il n'existe pas d'information de cet ordre qui soit exploitable en taxonomie bactérienne. La définition des espèces bactériennes par ce qu'elles font et non par ce qu'elles sont - selon la formule classique - n'a pu aboutir à des résultats nets. Le Tableau Ia, représentant les caractères d'identification des Leuconostoc, en est un exemple parmi d'autres. De plus, cette approche ne peut fournir aucun renseignement d'ordre évolutif.

Les critères que nous avons étudiés ne s'adressent pas aux caractères de différenciation des espèces mais au contraire à des communautés de structures complexes et codées dont les modifications sont minimes au cours de l'évolution à l'intérieur des espèces. Il ressort de notre travail que l'espèce pourrait se définir par une communauté de structure de l' ADN, mise en évidence par les hybridations, et par une communauté de structure de protéines isofonctionnelles, mise en évidence par leurs réactions immunologiques.

Nous essaierons de déterminer les limites de ces deux critères. Les hybridations ADN-ADN ne sont pas égales à 100 % entre toutes les souches d'une même espèce. Ce

fait a été très étudié par Brenner (69) qui a mis en évidence des hybridations E. coli - E. coli inférieures en pourcentage aux hybridations E. coli - Shigella. Quelle que soit la raison de ce phénomène, il témoigne de la possibilité de variations de structure qualitatives et/ ou quantitatives pour les génomes des diverses souches d'une même espèce.

Nous avons pu constater qu'à chaque groupe d'hybridation correspond un groupe immunologique précis. La méthode immunologique que nous avons utilisée est qualitative et par là même sans nuance. Cependant les travaux d'immunologie quantitative (micro-fixation du complément) de London et Gasser font apparaître à l'intérieur d'un groupe déterminé qualitativement (immunodiffusion) des différences de structures primaires significatives, si minimes soient elles.Nous retrouvons, alors, pour une protéine unique des légères variations intraspécifiques analogues aux variations intraspécifiques,à l'intérieur du génome entier révélées par les pourcentages d'hybridation.

Propositions taxonomiques.

A la suite de cette discussion sur les limites des critères définissant l'espèce bactérienne, nous proposons une nouvelle spéciation du genre Leuconostoc basée en grande partie sur l'immunologie comparée d'enzymes communs à toutes les souches du genre et sur les parentés génétiques révélées par les hybridations ADN-ADN. Le Tableau XXV présente les espèces que nous proposons et leurs caractères différentiels parallèlement aux nomenspecies décrits par E. Garvie dans la 8ème édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974).

ESPECES PROPOSEES*	NOMEN SPECIES (Bergey's 8ème édition)	Caractères culturaux pH	Caractères différentiels			SOUCHE TYPE NEO-TYPE ou REFERENCE
			Groupe immuno-logique	Hybridation ADN-ADN		
				intra-spécifiques	autres espèces	
L.oenos	*L.oenos*	4,2-4,8	G	-	< 10%	ATCC 2327
L.lactis	*L.lactis*	5,5-6,5	A	70-100%	10-60%	NCDO 533
L.paramesenteroides	*L.paramesenteroides*	5,5-6,5	F	50-100%	10-20%	NCDO 803
L.mesenteroides	*L.mesenteroides*	5,5-6,5	D	78-100%	10-50%	NCDO 523
	L.dextranicum	"				
	L.cremoris	"				
L.species	*L.mesenteroides*	5,5-6,5	E	85-100%	10-50%	NCDO 768
L.species	*L.mesenteroides*	5,5-6,5	B	-	10-40%	CIP 54171

* Pour la liste des souches appartenant aux espèces proposées, se référer au Tableau XXIII.

Tableau XXV : Proposition d'une nouvelle spéciation du genre *Leuconostoc*.

En examinant le Tableau XXV, nous voyons qu'une des espèces correspondant au nomenspecies du Bergey's Manual se distingue nettement des autres espèces par un caractère physiologique (culture à pH $\leq$ 4,8) : l'espèce Leuconostoc oenos. Parmi les autres espèces proposées, Leuconostoc lactis et Leuconostoc paramesenteroides ont été reconnues et différenciées par des caractères phénotypiques. Il existe donc, pour ces deux espèces, une bonne correspondance entre la classification classique et la notre. Ceci n'est plus le cas pour la quatrième espèce proposée : Leuconostoc mesenteroides qui rassemble des souches réparties précédemment dans trois espèces différentes : Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc dextranicum, Leuconostoc cremoris ; parallèlement quatre souches classées dans l'espèce Leuconostoc mesenteroides (NCDO 768, NCDO 882, NCIB 3351 et CIP 54171) en sont exclues. Ces quatre souches paraissent appartenir à deux nouvelles espèces pour lesquelles nous n'avons pas l'intention de proposer, à l'heure actuelle, de nouveaux noms eu égard au petit nombre de souches examinées.

Identification des espèces proposées.

La spéciation proposée correspond à une classification naturelle basée sur des structures moléculaires. Elle possède l'avantage de permettre une différenciation nette entre les espèces sur la base de tests immunologiques simples. En pratique, la caractérisation des espèces peut être faite avec un sérum spécifique soit anti-D-LDH, soit anti-G-6-PDH. Une réaction d'identité doit être recherchée ; pour cela, il sera nécessaire d'avoir un sérum spécifique anti-enzyme de chaque souche-type ou souche-référence. Ceci est réalisable

avec cinq sérums puisque nous avons vu que l'espèce Leuconostoc oenos était caractérisable par ses particularités physiologiques. La glucose-6-phosphate déshydrogénase présente l'avantage d'être un enzyme stable dont la purification est plus facile que celle de la D-lactate déshydrogénase (préparation rapide par électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide). Nous suggérons, donc, la glucose-6-phosphate déshydrogénase comme enzyme de référence pour l'identification des espèces par immunodiffusion.

En tenant compte des caractères classiques de la taxonomie, il serait possible, au cas où cela serait nécessaire, de reconnaitre trois biotypes à l'intérieur de l'espèce Leuconostoc mesenteroides. Ces biotypes correspondent aux trois espèces dont nous avons proposé la suppression. Le Tableau XXVI présente les caractères différentiels de ces trois biotypes résultant de l'étude d'E. Garvie (18) et de nos propres observations.

Espèce	Leuconostoc mesenteroides		
Biotypes	mesenteroides	dextranicum	cremoris
Souche-référence	NCDO 523	NCDO 812	NCDO 543
Production de dextrane :	+	+	-
Fermentation de:			
glucose	+	+	+
fructose	+	+	-
mannose	+	+	-
lactose	+	+(-)	+
maltose	+	+	-(+)
tréhalose	+	+	-
cellobiose	+(-)	-	-
ribose	+(-)	-	-
arabinose	+(-)	-	-
xylose	+	-	-
esculine	+	-	-
salicine	+	-	-

Tableau XXVI : Caractères phénotypiques différentiels des trois biotypes de Leuconostoc mesenteroides.

B I B L I O G R A P H I E

1. Arnheim N. Jr.,and Wilson A.C. (1967). Quantitative immunological comparison of bird lysozymes.J.Biol.Chem.,242,3951-3956.

2. Szeinberg A.,Zoreff E. and Golan R. (1969). Immunological gel diffusion study of relationships between erythrocyte catalase of various species. Biochim. Biophys. Acta,188,287-294.

3. Margoliash E.,Nisonoff A., and Reichlin M. (1970).Immunological activity of cytochrome c. I.Precipitating antibodies to monomeric vertebrate ctochromes c.J.Biol.Chem.,245,931-939.

II.Localization of a major antigenic determinant of human cytochrome c.J.Biol.Chem.,245,940-946.

III.Enhancement of antibody detection and immune response initiation by cytochrome c polymers.J.Biol;Chem.,245,947-954.

4. Sarich V.M.,and Wilson A.C. (1966). Quantitative immunochemistry and the evolution of primate albumins: micro-complement fixation.Science,154,1563-1566.

5. Arnheim N.,Prager E.M.,Wilson A.C. (1969).Immunological prediction of sequence differences among proteins.J.Biol.Chem.,244, 2085-2094.

6. Prager E.M.,and Wilson A.C. (1971).The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes.J.Biol.Chem.,246,5978-5989.

7. Margoliash E. and Fitch W.M. (1970).The evolutionary information content of protein amino acid sequences.Miami Winter Symposium,33-51,North Holland Publ.Co.,Amsterdam.

8. Dayhoff M.O. (1972).Atlas of protein sequence and structure,5. National Biomedical Research Foundation.

9. Benson A.,Tomoda K.,Chang J.,Matsueda G.,Lode E.T.,Coon M.J.,

and Yasunobu K.T.(1971).Evolutionary and phylogenetic relationships of rubredoxin-containing microbes.Biochem.Biophys.Res.Commun., 42,640-646.

10. Guo M.M.S. and Liu P.V.(1965).Serological specificities of ureases of Proteus species.J.Gen.Microbiol.,38,417-422.

11. Stanier R.Y.,Wachter D.,Gasser C.,and Wilson A.C.(1970).Comparative immunological studies of two Pseudomonas enzymes.J.Bacteriol.,102,351-362.

12. Gasser F. and Gasser C.(1971).Immunological relationships in the genera Lactobacillus and Leuconostoc.J.Bacteriol.,106,113-125.

13. London J.,Meyer E.Y. and Kulczyck S.(1971).Detection of relationships between Streptococcus faecalis and Lactobacillus casei by immunological studies with two forms of malic enzyme.J.Bacteriol.,108,196-201.

14. London J.,Meyer E.Y.,and Kulczyck S.(1971).Comparative biochemical and immunological study of malic enzyme from two species of lactic acid bacteria:evolutionary implications.J.Bacteriol., 106,126-137.

15. London J. and Kline K.(1973).Aldolase of lactic acid bacteria: a case history in the use of an enzyme as an evolutionary marker. Bacteriol.Rev.,37,453-478.

16. Cocks G.T. and Wilson A.C.(1972).Enzyme evolution in the Enterobacteriaceae.J.Bacteriol.,110,793-802.

17. Garvie E.I.(1967).The growth factor and amino acid requirements of species of the genus Leuconostoc,including Leuconostoc paramesenteroides (sp.nov.) and Leuconostoc oenos.J.Gen.Microbiol., 48,439-447.

18. Garvie E.I.(1967).Leuconostoc oenos sp. nov.J.Gen.Microbiol., 48,431-438.

19. Garvie E.I. (1969).Lactic dehydrogenases of strains of the genus Leuconostoc.J.Gen.Microbiol.,58,85-94.

20. Palleroni N.J.,Kunisawa R.,ContopoulosR.,Doudoroff M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus Pseudomonas.Int.J.Syst. Bacteriol.,23,333-339.

21. Lowry O.H.,Rosebrough N.J.,Farr A.L.,and Randall R.J.(1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent.J.Biol.Chem., 193,265-275.

22. Warburg O.,Christian W. (1941). Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase.Biochem. Zeitschrift,310,384-421.

23. Peterson E.,and Sober H. (1962). In Methods in Enzymology (Colowick S.P. and Kaplan N.O., Ed.),vol. V, 3-27, Academic Press, New York and London.

24. Davis B.J. (1964). Disc electrophoresis.II -Method and application to human serum proteins.Annals of the New York Academy of Sciences,121,404-427.

25. Chrambach A.,Reisfeld R.A.,Wyckoff M.,and Zaccari J. (1967). A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis.Anal.Biochem.,20,150-154.

26. Fine I.H.,Costello L.A., (1963). In Methods in Enzymology (Colowick S.P. and Kaplan N.O.,Ed.),vol. VI, 958-972, Academic Press,New York.

27. Jordan E.M.,Raymond S. (1967). Multiple analyses on a single gel electrophoresis preparation.Nature,216,78-80.

28. Oxenburgh M.S.,Snoswell A.M. (1965). Use of streptomycin in the separation of nucleic acids from protein in a bacterial extract.Nature,London,207,1416-1417.

29. Olive C. and Levy H.R. (1967).The preparation and some properties of cristalline glucose-6-phosphate dehydrogenase from Leu-

conostoc mesenteroides.Biochem.,6,730-736.

30. Hontebeyrie M.,and Gasser F.(1973).Séparation et purification de la D-lactico-déshydrogénase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis.Etude de quelques propriétés. Biochimie,55,1047-1056.

31. Garland R.C.(1973).Purification and properties of D-lactate dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides.Arch.Biochem.Biophys., 157,36-43.

32. Shapiro A.L.,Vinuela E.,Maizel J.V.(1967).Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrylamide gels.Biochem.Biophys.Res.Commun.,28,815-820.

33. Lineweaver H. and Burk D.(1934).The determination of enzyme dissociation constants.J.Amer.Chem.Soc.,56,658-666.

34. Gasser F.,Doudoroff M. and Contopoulos R.(1970).Purification and properties of six lactic dehydrogenases nicotinamide-adenine-dinucleotide dependent from different Lactobacillus species.J.Gen. Microbiol.,62,241-250.

35. Gordon G.L.,and Doelle H.W.(1975).Production of racemic lactic acid in Pediococcus cerevisiae cultures by two lactate dehydrogenases.J.Bacteriol.,121,600-607.

36. Gordon G.L.,and Doelle H.W.(1974).Molecular aspects for the metabolic regulation of the nicotinamide-adenine-dinucleotide-dependent D-lactate dehydrogenase from Leuconostoc.Microbios,9,199-215.

37. Tarmy E.M.,and Kaplan N.O.(1968).Kinetics of Escherichia Coli D-lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate controlled change in conformation.J.Biol.Chem.,243,2587-2596.

38. Léjohn H.B.(1971).D-lactate dehydrogenases in Fungi.J.Biol. Chem.,246,2116-2126.

39. Sanchez J.J.,Palleroni N.J.,Doudoroff M.(1975).Lactate dehydrogenases in Cyanobacteria.Arch.Microbiol.,104,57-65.

40. Wittenberger C.L.,and Fulco J.G.(1967).Purification and allosteric properties of a nicotinamide-adenine-dinucleotide linked D-specific lactate dehydrogenase from Butyribacterium rettgeri. J.Biol.Chem.,242,2917-2924.

41. Purohit K. and Turian G.(1972).D-lactate dehydrogenase from Allomyces.Partial purification and allosteric properties.Archiv. für Mikrobiol.,84,287-300.

42. Markert C.L.,Shaklee J.B.,Whitt G.S.(1975).Evolution of a gene. Science,189,102-114.

43. Wilson A.C.,Kaplan N.O.,Levine L.,Pesce A.,Reichlin M.,and Allison W.S.(1964).Evolution of lactic dehydrogenases.Fed.Proc., 23,1258-1266.

44. Olive C.,and Levy H.R.(1971).Glucose-6-phosphate dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides.II.Kinetics studies.J.Biol.Chem., 246,2047-2057.

45. Olive C.,and Levy H.R.(1971).Glucose-6-phosphate dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides.I.Physical studies.J.Biol.Chem., 246,2043-2046.

46. Tabita R.,and Lundgren D.G.(1971).Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the chemolithotroph Thiobacillus ferroxidans.J.Bacteriol.,108,343-352.

47. Schindler J.,and Schlegel H.G.(1969).Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus verschiedenen Bakterienarten durch ATP.Archiv. für Mikrobiol.,66,69.

48. Lessie T.,and Neidhart F.C.(1967).Adenosine triphosphate linked control of Pseudomonas aeruginosa glucose-6-phosphate dehydrogenase.J.Bacteriol.,93,1337-1345.

49. Probst I.,and Schlegel H.G.(1973).Studies on a gram-positive hydrogen bacterium,Nocardia opaca strain 1b.Archiv.für Mikrobiol., 88,319-330.

50. Blackkolb F.,and Schlegel H.G.(1968).Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Hydrogenomonas H16 durch ATP und $NADH_2$.Archiv.für Mikrobiol.,63,177-196.

51. Ohmann E.,Boriss R.,and Rindt K.P.(1970).Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in autotrophen Mikroorganismen.II.Die Regulation der Aktivität der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase in Euglena gracilis und Rhodopseudomonas spheroides.Zeitschrift für Allge. Mikrobiol.,10,37-53.

52. Tunail N.,and Schlegel H.G.(1972).Phosphoenol-pyruvate,a new inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase.Biochem.Biophys. Res.Commun.,49,1554-1560.

53. Senior P.J.,and Dawes E.A.(1971).Poly β-hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in Azotobacter beijerinckii.Biochem.J.,125,55-66.

54. Dennis D.,and Kaplan N.O.(1960).D- and L- lactic dehydrogenases in Lactobacillus plantarum.J.Biol.Chem.,235,810-818.

55. Mandell J.D.,and Hershy A.D.(1960).Preparation of methylated bovine serum albumin.Analyt.Biochem.,I,66.

56. Grabar P.and Williams C.A. (1955).Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.Biochem. Biophys.Acta,17,67.

57. De Man J.C.,Rogosa M.,and Sharpe M.E.(1960).A medium for the cultivation of lactobacilli.J.Appl.Microbiol.,23,130-135.

58.Ouchterlony O.(1968).Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis.Ann.Arbor.Science Publ.(Mich.)

59.Lapresle C.,Kaminski M. and Tanner C.(1959).Immunological study of the enzymatic degradation of human serum albumin:an analysis of the antigenic structure of a protein molecule.J. of Immun.,82,94-102.

60.Rogosa M.(1970).Characters used in the classification of Lactobacilli.Int.J.Syst.Bacteriol.,20,519-533.

61.Hemme D.(1974).Taxonomie des Lactobacilles homofermentaires du tube digestif du rat.Description de deux nouvelles espèces: Lactobacillus intestinalis,Lactobacillus murini.Thèse de doctorat ès Sciences.Université de Paris 7.

62.Britten R.J.,Pavich M. and Smith J.A new method for DNA purification.Carnegie Inst.Washington,Year Book,68,400-402.

63.Bernardi G.(1969).Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite.I.Chromatography of native DNA.Biochim.Biophys. Acta, 174,423-434.

64.Brenner D.J.,Fanning G.R.,Rake A.V.,Johnson K.E.(1969).Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite.Anal. Biochem.,28,447-459.

65.Burton K.(1968).Determination of DNA concentration with diphenylamine.Methods in Enzymology,vol XII,Part B,163-165,Academic Press New York and London.

66.Mandel M. and Marmur J.(1968).Use of ultra-violet absorbance temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA.Methods in Enzymology,vol XII,Part B,195-198, Academic Press New York and London.

67.Garvie E.I.,Zezula V.,and Valerie A.H.(1974).Guanine plus cytosine content of the deoxyribonucleic acid of the Leuconostocs and some heterofermentative Lactobacilli.Int.J.Syst.Bacteriol., 24,248-251.

68.Jones D.,and Sneath P.H.A.(1970).Genetic transfer and bacterial taxonomy.Bacteriol. Rev.,34,40-8I.

69.Brenner D.J.,Fanning G.R.,Skerman F.J.,and Falkow S.(1972). Polynucleotide sequence divergence among strains of Escherichia Coli and closely related organisms.J.Bacteriol.,109,953-965.

70.Brenner D.J.,Steigerwalt A.G.,Fanning G.R.(1972).Differentiation of Enterobacter aerogenes from Klebsiellae by deoxyribonucleic acid reassociation.Int.J.Syst.Bacteriol.,22,193-200.

71.Brenner D.J.,Fanning G.R.,Miklos G.V.,and Steigerwalt A.G.(1973). Polynucleotide sequence relatedness among Shigella species.Int. J.Syst.Bacteriol.,23,1-7.

72.Brenner D.J.,Steigerwalt A.G.,Miklos G.V.,and Fanning G.R.(1973) Deoxyribonucleic acid relatedness among Erwiniae and other Enterobacteriaceae: the soft-rot organisms (genus Pectobacterium, Waldee).Int.J.Syst.Bacteriol.,23,205-216.

73.Brenner D.J.(1973).Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of enteric bacteria.Int.J.Syst.Bacteriol.,23,298-307.

74.Brenner D.J.,Fanning G.R.,and Steigerwalt A.G.(1974).Polynucleotide sequence relatedness in Edwarsiella tarda.Int.J.Syst. Bacteriol.,24,186-190.

75.London J.(1971).Detection of phylogenetic relationships between Steptococci and Lactobacilli by a comparative biochemical and immunological study of isofunctional malic enzymes.J.Dent. Res.,50,1083-1093.

76.London J.,Chace N.M.,and Kline K.(1975).Aldolase of acid bacteria : immunological relationships among aldolases of Streptococci and Gram-positive nonsporeforming anaerobes.Int.J.Syst. Bacteriol.,25,114-123.

77.Hontebeyrie M.,and Gasser F.(1975).Comparative immunological relationships of two distinct sets of isofunctional dehydrogenases in the genus Leuconostoc.Int.J.Syst.Bacteriol.,25,1-6.

78.De Vries W.,Kapteijn W.M.C.,Van der Beek E.G.,Stouthamer A.H. (1970).Molar growth yields and fermentation balances of Lactobacillus casei L 3 in batch cultures and in continuous cultures.J. Gen.Microbiol.,63,333-345.

79.Holland R.,and Pritchard G.G.(1975).Regulation of the L-lactate dehydrogenase from Lactobacillus casei by fructose-1,6-diphosphate and metal ions.J.Bacteriol.,121,777-784.

80.Wolin M.J.(1964).Fructose-1,6-diphosphate requirement of streptococcal lactate dehydrogenases.Science,146,775-777.

81.Wittenberger C.L.,and Angelo N.(1970).Purification and properties of a fructose-1,6-diphosphate activated lactate dehydrogenase from Streptococcus faecalis.J.Bacteriol.,101,717-724.

82.Brown A.T.,and Wittenberger C.L.(1972).Fructose-1,6-diphosphate-dependent lactate dehydrogenase from a cariogenic Streptococcus : purification and regulatory properties.J.Bacteriol.,110, 604-615.

83.Roop D.R.,Mundt J.O.,and Riggsby W.S.(1974).Deoxyribonucleic acid hybridization studies among some strains of group D and group N Streptococci.Int.J.Syst.Bacteriol.,24,330-337.

84.Dellaglio F.,Botazzi V.,Trovatelli L.D.(1973).Deoxyribonucleic acid homology and base composition in some thermophilic Lactobacilli.J.Gen.Microbiol.,74,289-297.

85.Brenner D.J.,Fanning G.R.,Jonhson R.V.,Citarella and Falkow S.(1969).Polynucleotide sequence relationships among members of Enterobacteriaceae.J. Bacteriol.,98,637-650.

86.Palleroni N.J., Ballard R.W., Ralston E. and Doudoroff M. (1972).Deoxyribonucleic acid homologies among some Pseudomonas species.J.Bacteriol., 110, 1-11.

87.Gasser F., Mandel M., Rogosa M.(1970).Lactobacillus jensenii n. sp., a new representative of the subgenus Thermobacterium. J.Gen.Microbiol., 62, 219-222.

88.King M.C. and Wilson A.C.(1975).Evolution at two levels in Humans and Chimpanzees.Science, 188, 107-116.

ANNEXE 1 - ORIGINE DES PRODUITS

PRODUITS ORGANIQUES

Adjuvant de Freund	Difco
Ammonium citrate	Baker
Barbital	Merck
Barbiturique acide	Baker
Bleu de bromophénol	Française des Matières Colorantes
Bleu de Coomassie	Colab Laboratoire, Chicago.
p.Chloromercuribenzoate	Mann Research Laboratories.
Diphenylamine	Prolabo
Dithiothréitol	Calbiochem
EDTA	Baker
Extrait de Levure	Difco
Ferritine	Calbiochem
Glucose	Française des Matières Colorantes
Glucose-6-phosphate	Calbiochem
Glycine	Eastman Kodak
Ionagar	Oxoïd
D-lactate, L-lactate	Sigma
2-mercaptoéthanol	Eastman Kodak
Merthiolate	Touzart et Matignon
NAD, NADP, NADH	Sigma
Nitro Blue Tétrazolium	Sigma
Orcinol	Prolabo
Ovalbumine	Calbiochem
Phénazine méthosulfate	Sigma

POPOP	Merck
PPO	Merck
Pyruvate de Sodium	Calbiochem
Sérumalbumine bovine	Armour Pharmaceutical Company
Sodium acétate	Baker
Sodium dodécylsulfate	Prolabo
Sodium maléate	Sigma
Streptomycine sulfate	SPECIA
TCA	Merck
Toluène R.P.	Prolabo
Tris	Baker
Tryptone	Difco
Tween 80	Serlabo
Urée	Merck

PRODUITS POUR CHROMATOGRAPHIES

DEAE - Cellulose	Bio-Rad
Hydroxylapatite	Bio-Rad
Sephadex G-200	Pharmacia

PRODUITS POUR ELECTROPHORESES

Acrylamide	Eastman Kodak
Bisacrylamide	Eastman Kodak
Cyanogum 4I	E. C. Apparatus
TEMED	Eastman Kodak

PRODUITS MINERAUX

Ammonium persulfate	Baker
Ammonium sulfate	Schwarz Mann
Magnésium sulfate R. P.	Prolabo
Manganèse sulfate	Merck
Potassium phosphate monopotassique	Prolabo
Potassium phosphate dipotassique	Baker
Réactif de Folin	Merck
Sodium azoture	Baker
Sodium phosphate monosodique	Baker
Sodium phosphate disodique	Prolabo

ENZYMES

Cytochrome C	Sigma
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	Sigma
L-lactate deshydrogénase (coeur de boeuf)	Boehringer
Lysozyme	Merck
Pepsine	Calbiochem
Phosphatase alcaline d'E. coli	Sigma
Pronase	Merck
Trypsine	Worthington

PRODUITS RADIOACTIFS

Thymidine tritiée	C.E.A. France

*

* *

Annexe 2 A

Résultats d'expériences de double diffusion avec le sérum anti-D-LDH de Leuconostoc lactis NCDO 546 (30 µl dans le puits central).

1. Les puits extérieurs contiennent les extraits bruts (0,5 unité d'activité D-L-DH) de:

1.1. Image I:

-L.mesenteroides NCDO 523 (puits n° 1 et 4),

-L.cremoris NCDO 829 (puits n° 2),

-L.dextranicum NCDO 812 (puits n° 3),

-L.dextranicum NCDO 529 (puits n°5),

-L.mesenteroides NCDO 1533 (puits n°6).

1.2. Image II:

-L.mesenteroides NCIB 9317 (puits n°1 et 4),

-L.mesenteroides NCIB 8710 (puits n° 2),

-L.mesenteroides NCIB 8013 (puits n° 3),

-L.dextranicum NCIB 3356 (puits n° 5),

-L.mesenteroides NCIB 3351 (puits n° 6).

1.3. Image III:

-L.paramesenteroides NCDO 803 (puits n° 1 et 4),

-L.dextranicum NCDO 529 (puits n° 2),

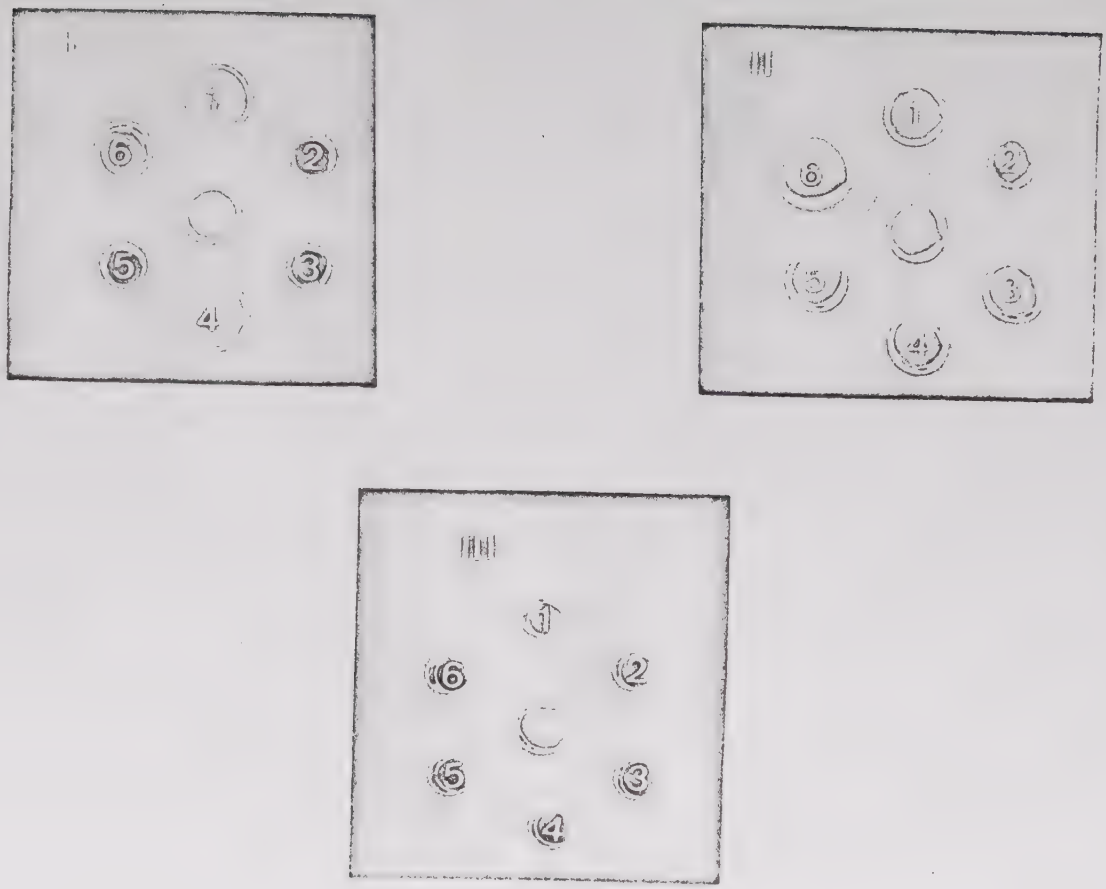
-L.dextranicum NCDO 812 (puits n° 3),

-L.mesenteroides NCDO 522 (puits n° 5),

-L.cremoris NCDO 829 (puits n° 6).

==========

ANNEXE 2 A



Expériences de double diffusion avec le sérum anti-D-LDH de Leuconostoc lactis NCDO 546.

Annexe 2 B

Résultats d'expériences de double diffusion avec le sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc lactis NCDO 546 (60 µl dans le puits central).

1. Les puits extérieurs contiennent les extraits bruts (0,5 unité d'activité G-6-P-DH) de:

1.1. Image I:

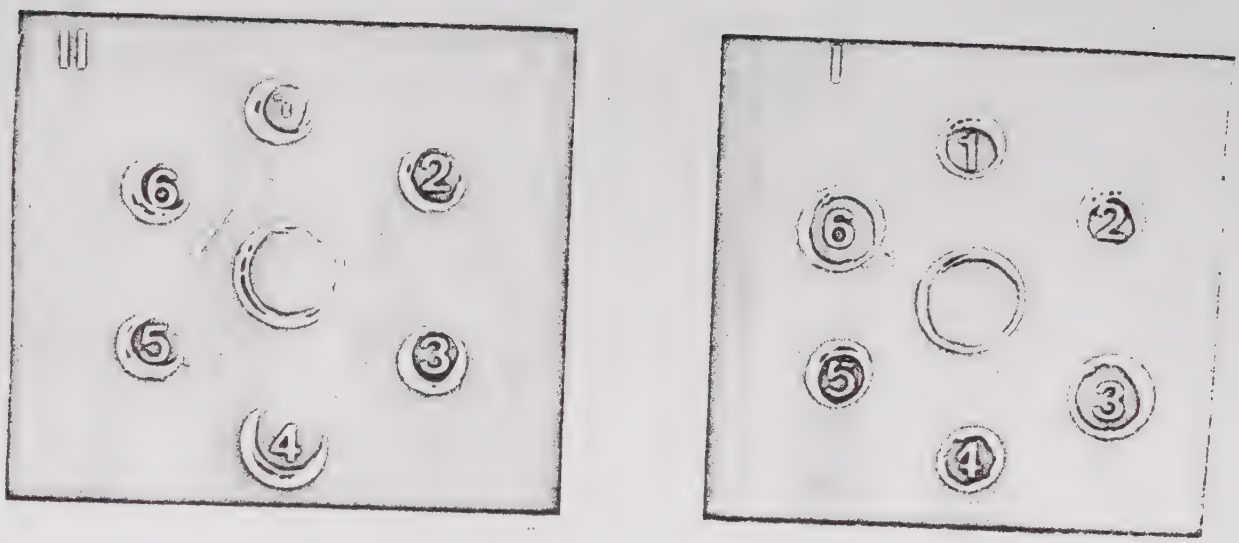
-L.dextranicum NCDO 529 (puits n° 1 et 4),
-L.mesenteroides NCDO 1533 (puits n° 2),
-L.dextranicum NCDO 812 (puits n° 3),
-L.mesenteroides NCDO 522 (puits n° 5),
-L.cremoris NCDO 829 (puits n° 6).

1.2. Image II:

-L.mesenteroides CIP 54168 (puits n° 1),
-L.lactis NCDO 549 (puits n° 2),
-L.mesenteroides NCIB 3351 (puits n° 3),
-L.paramesenteroides CIP 54169 (puits n° 4),
-L.mesenteroides NCDO 882 (puits n° 5),
-L.mesenteroides NCDO 522 (puits n° 6).

==========

ANNEXE 2 B



Expériences de double diffusion avec le sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc lactis NCDO 546.

Annexe 2 C

Résultats d'expériences de double diffusion avec le sérum anti-G-6-P-DH de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768 (20 µl dans le puits central).

1.Les puits extérieurs contiennent les extraits bruts (2 unités d'activité G-6-P-DH) de:

1.1. Image I:

-L.mesenteroides NCDO 768 (puits n° 1 et 4),

-L.mesenteroides NCIB 9317 (puits n° 2),

-L.lactis NCDO 532 (puits n° 3),

-L.cremoris NCDO 829 (puits n° 5),

-L.mesenteroides CIP 54171 (puits n° 6).

1.2. Image II:

-L.mesenteroides NCIB 8710 (puits n° 1),

-L.lactis NCDO 546 (puits n° 2),

-L.mesenteroides NCIB 9317 (puits n° 3),

-L.mesenteroides ATCC 10830 (puits n°4),

-L.mesenteroides CIP 54171 (puits n°5),

-L.paramesenteroides NCDO 803 (puits n°6).

1.3. Image III:

-L.mesenteroides NCDO 1533 (puits n° 1 et 4),

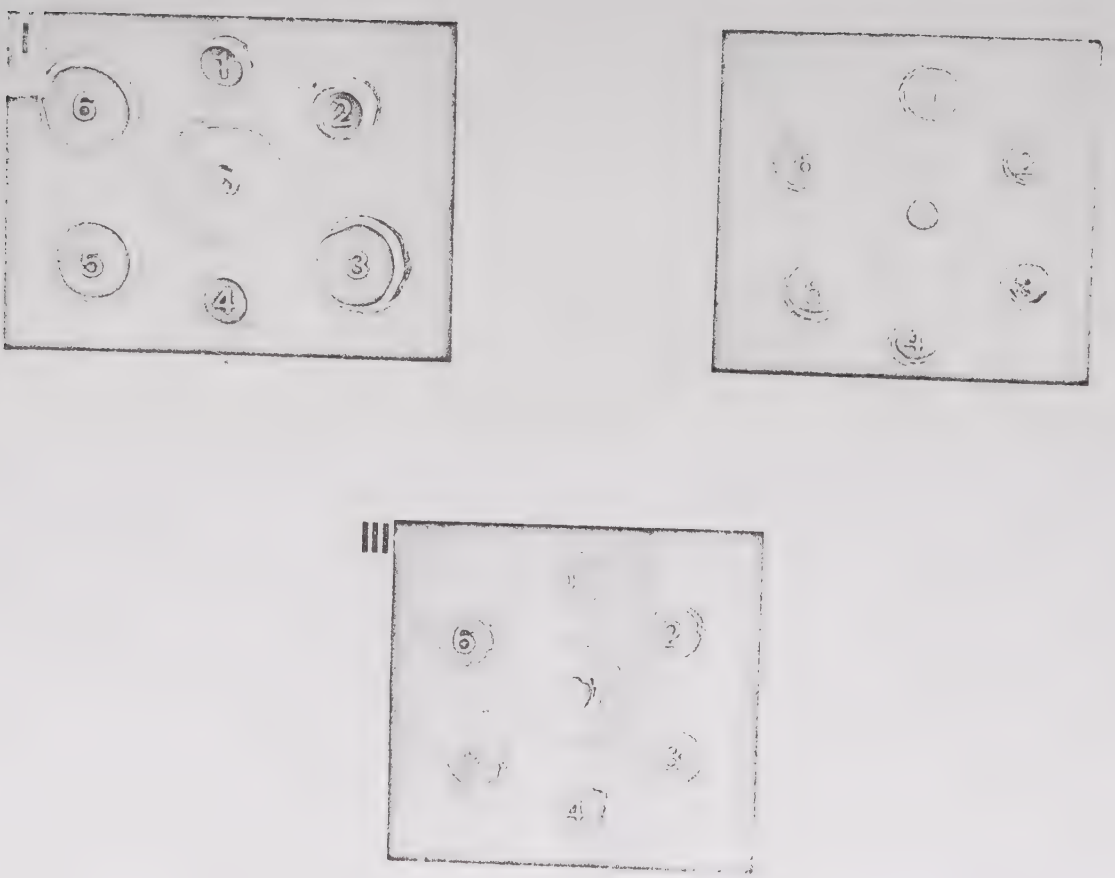
-L.mesenteroides ATCC 10830 (puits n° 2),

-L.mesenteroides V 16 (puits n° 3 et 5),

-L.mesenteroides NCIB 9317 (puits n°6).

==========

ANNEXE 2 C



Expériences de double diffusion avec le sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768.

Annexe 3 - Abréviations des noms des Collections.

ATCC = The American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

BUCSAV = Biologický Ustav , Ceskoslovenská Akademie Ved, Prague, Czechoslovakia.

CIP = Collection de l' Institut Pasteur, Paris.

NCDO = National Collection of Dairy Organisms, Reading, England.

NCIB = National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Scotland.

NCTC = National Collection of Type Cultures, London, England.

NRC = National Research Council, Ottawa, Canada.

NRRL = Northern Utilization Research and Development Division, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois.

ANNEXE 3 - REPERTOIRE DES SOUCHES APPARTENANT A DIFFERENTES COLLECTIONS

Leuconostoc lactis : NCDO 533 = ATCC 19256.

Leuconostoc cremoris : NCDO 543 = ATCC 19254.

Leuconostoc dextranicum : NCDO 529 = ATCC 19255.

NCDO 517 = NCTC 3355 = NRRL-B-1145 = NCIB 3355.

NCIB 2706 = NCDO 800 = NCDO 1582 = NCTC 2706 = NRRL-B-1141.

NCIB 3356 = NCDO 801 = NCDO 1589 = NCTC 3356 = NRRL-B-1146.

NCIB 3739 = NCDO 824 = NCTC 3739.

NCDO 812 = NCDO 516 = NRRL-B-641 = NCIB 8189 = NRC 499 = ATCC 8082.

Leuconostoc mesenteroides: NCIB 3351 = NCTC 3351 = NRRL-B-1142.

NCIB 9317 = NCDO 797 = ATCC 14935 = NCIB 6992 = NCIB 8022.

NCDO 768 = ATCC 12291 = NCIB 8699.

CIP 54168 = Mac Cleskey 154 A.

CIP 54169 = NCDO 540 = ATCC 10881 = NRRL-B-1068 = NCIB 9311.

CIP 54170 = ATCC 10880 = NRRL-B-1438.

CIP 54171 = ATCC 10883.

NCIB 8013 = NCDO 518 = NRRL-B-1120 = ATCC 8358.

NCDO 523 = NCIB 8023 = NRRL-B-1118 = ATCC 8293.

ATCC 10830 = NCDO 553 = NCIB 8590 = NRRL-B-512 = BUCSAV 315.

NCIB 8710 = NCDO 796 = NRRL-B-512 F =ATCC 10830 a.

NCIB 9319 = NCDO 1594 = NCDO 1598 = NRRL-B-1375.

Les souches que nous avons utilisées sont soulignées.

R E S U M E

Longtemps, les classifications bactériennes ont reposé sur des caractères phénotypiques. Les récentes connaissances concernant le génome et son expression permettent d'envisager une classification naturelle des bactéries reposant sur la phylogénèse. Une telle classification peut être établie à partir de la comparaison des molécules d'ADN ou des molécules protéiques.

Nous avons étudié, dans le but de contibuer à l'établissement d'une telle classification, le groupe bactérien des Leuconostoc.

La première partie de notre travail a consisté en la comparaison immunologique de protéines isofonctionnelles. Les enzymes choisis ont été: - la D-lactate déshydrogénase NAD-dépendante (E.C.:1.1.1.28) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase NAD (P)-dépendante (E.C.:1.1.1.49) de Leuconostoc lactis NCDO 546,

- la glucose-6-phosphate déshydrogénase NAD (P)-dépendante de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768.

Ces trois enzymes ont été purifiés et trois immuns-sérums spécifiques ont été préparés chez le lapin. Quelques études biochimiques ont été faites pour caractériser les deux enzymes de Leuconostoc lactis. Pour la D-lactate-déshydrogénase, les constantes cinétiques, le pH optimum d'activité, la stabilité thermique en présence ou en absence des substrats, la masse moléculaire et le nombre de sous-unités ont été déterminés. Pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase, les constantes cinétiques, le pH optimum d'activité et la masse moléculaire

ont été déterminés.

Avec les trois immuns-sérums spécifiques,nous avons pu comparer,par double diffusion en gel (méthode d' Ouchterlony),les enzymes isofonctionnels (D-LDH et G-6-PDH) d'une cinquantaine de souches.Six groupes de souches ayant même spécificité antigénique ont été identifiés,avec chacun des trois immuns-sérums.Ces six groupes sont identiques quel que soit l'enzyme étudié (D-LDH ou G-6-PDH) d'une part, quelle que soit l'origine de l'enzyme utilisé pour la préparation de l'immun-sérum (G-6-PDH de Leuconostoc lactis ou de Leuconostoc mesenteroides),d'autre part.

Dans la deuxième partie de ce travail,nous avons étudié les homologies de séquences des ADN des cinquante souches.Ces ADN ont été préparés,purifiés et caractérisés par leur température de fusion.Pour les hybridations ADN-ADN,quatre références ont été choisies: l'ADN de Leuconostoc lactis NCDO 546,l'ADN de Leuconostoc paramesenteroides NCDO 803,l'ADN de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768 et l' ADN de Leuconostoc mesenteroides NCDO 523.Les résultats font apparaitre six groupes d'hybridation qui ont la même composition que les groupes immunologiques.

Il est remarquable de noter la très bonne concordance des résultats obtenus par deux approches différentes de la taxonomie bactérienne.En conclusion,certains remaniements à l'intérieur de genre Leuconostoc nous semblent justifiés.Certaines espèces déjà existantes comme L. lactis, L. paramesenteroides et L. oenos sont homogènes selon les critères étudiés et demeurent inchangées.Ceci n'est plus vrai pour d'autres espèces comme L.cremoris,L. dextranicum et L. mesenteroides.Parmi ces espèces,un grand groupe se distingue,rassemblant toutes les souches de L. cremoris et de L. dextranicum ainsi que la plupart des souches de L.mesenteroides,formant une véritable espèce nouvelle selon nos

critères.Deux autres groupes composés de quelques souches de L. mesenteroides sont clairement individualisés par les deux approches: immunologie d'enzymes et hybridations ADN-ADN.

*

* *

- TABLE DES MATIERES -

Pages

AVANT-PROPOS 1

INTRODUCTION 2

CHAPITRE I : Purification de la D-lactate déshydrogénase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de L. lactis NCDO 546 et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de L. mesenteroides NCDO 768.

I. - MATERIEL ET METHODES 8

II. - RESULTATS

1. Séparation des deux enzymes. 13

2. Purification de la D-lactate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546. 14

3. Purification de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis NCDO 546. 15

4. Purification de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768. 16

III. - DISCUSSION. 18

CHAPITRE II : Etude de quelques propriétés de la D-lactate déshydrogénase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis.

I. - MATERIEL ET METHODES 19

II. - RESULTATS

1. Propriétés de la D-lactate déshydrogénase de Leuconostoc lactis. 21

2. Propriétés de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Leuconostoc lactis. 26

III. - DISCUSSION. 30

CHAPITRE III : Etude immunologique comparative entre enzymes isofonctionnels chez les Leuconostoc.

I. - MATERIEL ET METHODES. 36

II. - RESULTATS.

1. Spécificité des immuns-sérums. 44
2. Etude à partir du sérum anti-D-LDH de Leuconostoc lactis NCDO 546. 45
3. Etude à partir du sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc lactis NCDO 546. 49
4. Etude à partir du sérum anti-G-6-PDH de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768. 52

III. - DISCUSSION. 56

CHAPITRE IV : Etude des taux d'hybridation des acides désoxyribonucléiques de cinquante souches de Leuconostoc.

I. - MATERIEL. 62

II. - METHODES. 64

1. Incorporation de thymidine ^{3}H dans les souches de référence. 64
2. Extraction de l' ADN. 65
3. Purification de l' ADN. 66

4. Obtention des ADN marqués simples brins. 66

5. Dosages des acides nucléiques. 66

6. Dénaturation thermique et détermination du Tm.Calcul du contenu en G + C. 67

7. Hybridations des acides nucléiques ADN-ADN. 68

III. - RESULTATS.

1. Détermination du Tm et du contenu en G + C. 70

2. Hybridations à partir de l' ADN de Leuconostoc lactis NCDO 546. 72

3. Hybridations à partir de l' ADN de Leuconostoc mesenteroides NCDO 768. 72

4. Hybridations à partir de l' ADN de Leuconostoc mesenteroides NCDO 523. 72

5. Hybridations à partir de l' ADN de Leuconostoc paramesenteroides NCDO 803. 75

IV. - DISCUSSION. 75

DISCUSSION GENERALE. 81

- Etudes immunologiques d'enzymes chez les bactéries. 82

- Etude du genre Leuconostoc. 85

BIBLIOGRAPHIE. 95

ANNEXES 105

RESUME. 112

*

* *